

Doctorado en Ciencia Animal

Tesis

Identificación molecular de subtipos de *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7 asociados a patogenicidad y a virulencia

Por: Juliana González

**Facultad
de
Ciencias Veterinarias
U.N.C.P.B.A.**



2019

Doctorado en Ciencia Animal
Tesis

**Identificación molecular de subtipos de *Escherichia coli*
verotoxigénico O157:H7 asociados a patogenicidad y a
virulencia**

Por: Juliana González

Facultad de Ciencias Veterinarias
U.N.C.P.B.A.

Directora: Dra. Ana Victoria Bustamante
Co-directora: Dra. Andrea Mariel Sanso

Miembros del Jurado:

Dra. Marta Mollerach
Dr. Juan Pedro Lirón
Dra. Laura Maté

Agradecimientos

*A mis directoras de tesis, Ana y Mariel, por su enseñanza diaria, por su dedicación,
paciencia y apoyo absoluto.*

Al grupo del Laboratorio de Inmunquímica y Biotecnología.

A Jime, fue hermoso haber compartido todo este trayecto con vos.

*A las Julis, a Viqui, a Ro, por el acompañamiento y aguante incondicional, no hubiera
sido lo mismo sin ustedes. Gracias por todas las risas (y llantos...) compartidos.*

*A mis amigas de siempre, Guada y Jesito, por ser incondicionales. A Dante, por todas
las locuras compartidas.*

*Mi mayor agradecimiento a mis papás, quienes me apoyaron con espíritu alentador. A
Cata, Joaco y Fer, mis hermanos y a mi familia, que me acompañan cada día.*

Resumen

Escherichia coli verotoxigénico (VTEC) representa un grupo muy importante de patógenos emergentes, causante de diarrea y severas enfermedades en seres humanos, tales como colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (SUH). El SUH afecta mayormente a niños menores de 5 años, es la principal causa de insuficiencia renal aguda, una de las más importantes de insuficiencia renal crónica y puede causar la muerte. El bovino es el principal reservorio y los alimentos contaminados, la principal vía de contagio al hombre. Argentina posee la mayor incidencia a nivel mundial de SUH y una alta prevalencia de VTEC en bovinos y alimentos derivados. El serotipo O157:H7 es el mayormente involucrado en los casos de enfermedad en el mundo, y en Argentina, también el más frecuentemente asociado al SUH. Sin embargo, no todos los aislamientos de O157:H7 tienen la misma capacidad de infectar y de causar enfermedad en el hombre. Estudios filogenéticos determinaron que las cepas O157:H7 integran subpoblaciones de dispersión mundial, las cuales diferirían en relación a su asociación con enfermedad. A partir del análisis comparativo de genomas, se han descripto varios métodos de subtipificación molecular, los cuales analizan distintas regiones y tipos de variación en el genoma. La combinación de los datos obtenidos por esta variedad de metodologías puede ofrecer una visión más amplia y robusta sobre la estructura poblacional y la virulencia de este serotipo. En este contexto se plantearon como objetivos conocer la diversidad genética de VTEC O157:H7 de Argentina, en particular de aquellas cepas que están circulando en la región pampeana, e identificar subtipos asociados a patogenicidad y virulencia. Para ello, se usaron distintos métodos de subtipificación molecular, tales como polimorfismos específicos de linaje (LSPA6), polimorfismos de nucleótido simple (SNP) (*rhsA* 3468 C>G y *tir* 255 T>A), análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA), y determinación de filogrupos. Por otro lado se analizó la presencia de genes relacionados con virulencia, tales como genes que codifican factores putativos de virulencia (FPV), genes codificados en plásmidos, de genes que codifican efectores no codificados en LEE (*nle*), presentes en islas de patogenicidad y genes que codifican factores de adherencia. Como complemento, se evaluó también, la actividad citotóxica de los aislamientos. El 98 % de ellos pertenecieron al linaje I/II (2 % al linaje II). El 100 % presentó el alelo del SNP (8_*rhsA*) correspondiente al clado 8. Un alto porcentaje de aislamientos presentó en alelo *tir* 255 T>A T, asociado a hipervirulencia, y fue asignado al filogrupo E. Según el MLVA se encontró una amplia diversidad genética. Todos los aislamientos mostraron el perfil plasmídico *ehxA-espP-katP-stcE* y poseyeron los genes *ehaA*, *elfA*, *iha* y *lpfA* variantes *lpfA1-3*, *lpfA2-2* y ECSP_0242. Las frecuencias de los genes ECSP fueron 95 % ECSP_2687, 88 % ECSP_3286, 86 %

ECSP_3620, 53 % ECSP_2870/2872 y 44 % ECSP_1733. Los aislamientos se agruparon en once perfiles *nle*, el 46 % fueron positivos para todos los genes *nle*, mientras que los aislamientos restantes, excepto dos, carecieron de *nleF* mostrando la OI-71 incompleta. Todas las cepas O157:H7, excepto el aislamiento identificado como linaje II, fueron citotóxicas en células Vero. Los resultados indican que las cepas de la región pampeana de Argentina son un grupo filogenéticamente homogéneo que presenta diversidad genética en relación a sus perfiles MLVA y de genes *nle*. La pertenencia de los aislamientos al clado hipervirulento 8 y al linaje I/II, la alta prevalencia del alelo *tir* 255 T>A T y de genes de factores putativos de virulencia, permite asignar a la mayoría de las cepas O157:H7 de esta región un alto riesgo para la salud pública.

Summary

Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC) O157:H7 is the dominant serotype isolated from patients with HUS and, Argentina has the highest rate of HUS in the world. However, not all O157:H7 isolates have the same ability to infect and cause disease in humans. Molecular typing had allowed to identify subpopulations related to the origin and virulence of O157:H7 strains. Our aim was to perform a genetic characterization of 43 O157:H7 strains isolated in Argentina mostly from cattle and humans in order to establish the potential public health risk. For this purpose, a combination of molecular subtyping methods were used, lineage-specific polymorphisms (LSPA6), simple nucleotide polymorphisms (SNP) (*rhsA* 3468 C>G y *tir* 255 T>A), multiple *loci* VNTR analysis (MLVA) and phylotyping determination; on the other hand, analysis of genes related to virulence, such as genes encoding putative virulence determinants (FPV), factors codified in plasmids, effectors not codified in LEE (*nle*) and genes encoding adherence determinants. Also, the cytotoxicity activity of the isolates was evaluated. The 98 % of them belonged to lineage I/II (2 % lineage II). All isolates carried the clade 8 SNP variant (8_*rhsA*). A high percentage of isolates presented *tir* allele 255 T>A T, associated with hypervirulence, and was assigned to phylogroup E. According to MLVA, a wide genetic diversity was found. All isolates showed the plasmid profile *ehxA-espP-katP-stcE* and harbored *ehaA*, *elfA*, *iha* and *lpfA* variants *lpfA1-3* and *lpfA2-2* and, ECSP_0242. The frequencies of the remaining ECSP genes were 95 % ECSP_2687, 88 % ECSP_3286, 86 % ECSP_3620, 53 % ECSP_2870/2872 and 44 % ECSP_1733. Isolates were grouped into eleven *nle* profiles, 46 % were positive for all *nle* genes, while the remaining isolates, except two, showed incomplete OI-71, particularly lacked *nleF*. All O157:H7 strains, except the isolate identified as lineage II, were cytotoxic on Vero cells. Results point out that argentinean pampa region strains are a phylogenetically homogenous group, which shows genetic diversity in MLVA and *nle* profiles. The belonging of the isolates to hypervirulent clade 8 and lineage I/II, the high prevalence of the allele *tir* 255 T>A T and *nle* and putative virulence factors genes, would allow assigning most O157:H7 strains of this region a high risk to public health.

Palabras claves

Escherichia coli verotoxigénico, O157:H7, Subtipificación, MLVA, SNP, Factores de virulencia, Islas de Patogenicidad

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
μl	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	<i>Attaching and Effacing Lesion</i> (Lesión de adherencia y borrado)
CO₂	Dióxido de Carbono
CH	Colitis Hemorrágica
D_N	Índice de diversidad genética de <i>Nei</i>
dNTP	Desoxirribonucleótido 5-trifosfato
D_S	Índice de diversidad de <i>Simpson</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ETA	Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FPV	Factores putativos de virulencia
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
H	Antígeno flagelar
hs	Horas
l	Litros
LB	Luria Bertani
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i> (<i>Locus</i> de borrado del enterocito)
LSPA-6	<i>Lineage Specific Polymorphism Assay</i> (Análisis de polimorfismos específicos de linaje)

mg	Miligramos
MGE	<i>Mobile Genetic Elements</i> (Elementos genéticos móviles)
min	Minutos
ml	Mililitros
MLVA	<i>Multiple Loci VNTR Analysis</i> (Análisis de múltiples <i>loci</i> VNTR)
mM	Milimolar
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (Tipificación de secuencias de múltiples <i>locus</i>)
MRA	<i>Molecular Risk Assessment</i> (Evaluación de riesgo molecular)
MST	<i>Minimun Spanning Tree</i> (Árbol expandido mínimo)
<i>nle</i>	Genes codificantes de efectores no codificados en LEE
O	Antígeno somático
OI	Islas O
OR	<i>Odds ratios</i>
PAI	<i>Pathogenicity Islands</i> (Islas de patogenicidad)
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (<i>Buffer</i> fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de campo pulsado)
pmol	Picomoles
pO157	Plásmido de O157 enterohemorrágico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción)
rpm	Revoluciones por minuto
RTE	<i>Ready To Eat food</i> (Alimentos listos para consumir)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismos de nucleótido simple)

SST3	Sistema de secreción de tipo III
STEC	<i>E. coli</i> productor de toxinas Shiga
Stx	Toxinas Shiga
TBE	<i>Buffer</i> Tris, Borato, EDTA
TEMED	Tetrametilen-diamina
Temp	Temperatura
Tir	Receptor translocado de la intimina
U	Unidades
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages</i> (Método de agrupamiento de pares no ponderados usando promedios aritméticos)
UR	Unidad de repetición
UV	Radiación ultravioleta
V	Voltios
VNTR	<i>Variable Number Tandem Repeats</i> (Repeticiones en tándem de número variable)
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigénico
Vtx	Verotoxinas

ÍNDICE

Introducción.....	1
Hipótesis.....	2
Objetivos.....	3

CAPÍTULO I: CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA TEMÁTICA

1.1 <i>Escherichia coli</i> verotoxigénico.....	5
1.2 Síndrome urémico hemolítico.....	5
1.3 Reservorios y vías de transmisión de VTEC.....	6
1.4 Factores de virulencia de VTEC.....	7
1.5 Patogénesis de VTEC.....	9
1.6 VTEC O157:H7.....	10
1.7 Subtipificación molecular de VTEC O157:H7.....	12
1.8 Genes codificantes de factores de virulencia en VTEC O157:H7.....	13

CAPÍTULO II: SECCIONES EXPERIMENTALES

2.1 Aislamientos bacterianos.....	16
2.2 Cepas de referencia.....	16
2.3 Obtención de ADN.....	16

SECCIÓN EXPERIMENTAL I: *Subtipificación molecular de aislamientos nativos VTEC O157:H7*

2.4. Objetivo.....	17
--------------------	----

2.4.1 *Análisis de Polimorfismos Específicos de Linaje (LSPA-6)*

Introducción.....	18
Materiales y métodos.....	18
Resultados.....	19

2.4.2 *Análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP)*

a) *Identificación de aislamientos pertenecientes al clado 8*

Introducción.....	23
Materiales y métodos.....	23
Resultados.....	24

b) *Análisis de polimorfismos A/T en el gen *tir**

Introducción.....	26
Materiales y métodos.....	26
Resultados.....	27

2.4.3 *Análisis de Múltiples loci VNTR (MLVA)*

Introducción.....	30
Materiales y métodos.....	30
Resultados.....	32

2.4.4 Determinación de grupos filogenéticos	
Introducción.....	37
Materiales y métodos.....	38
Resultados.....	38
 SECCIÓN EXPERIMENTAL II: <i>Análisis de genes relacionados con virulencia</i>	
2.5 Objetivo.....	43
 2.5.1 Detección de genes codificantes de factores putativos de virulencia (FPV)	
Introducción.....	44
Materiales y métodos.....	44
Resultados.....	45
 2.5.2 Detección de genes plasmídicos que codifican factores de virulencia	
Introducción.....	50
Materiales y métodos.....	51
Resultados.....	51
 2.5.3 Detección de genes efectores no codificados en LEE (nle)	
Introducción.....	54
Materiales y métodos.....	54
Resultados.....	55
 2.5.4 Detección de genes que codifican factores de adherencia	
Introducción.....	63
Materiales y métodos.....	63
Resultados.....	64
 SECCIÓN EXPERIMENTAL III: <i>Evaluación de citotoxicidad de aislamientos nativos VTEC O157:H7</i>	
2.6 Objetivo.....	66
Introducción.....	66
Materiales y métodos.....	66
Resultados.....	67
 SECCIÓN EXPERIMENTAL IV	
2.7 <i>Análisis comparativo de los datos obtenidos en relación al origen de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados</i>	
Objetivo.....	70
Materiales y métodos.....	70
Resultados.....	70
 CAPÍTULO III: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	
3.1 Discusión.....	78
3.2 Conclusiones.....	85
Referencias bibliográficas.....	86

Anexos

I. Datos complementarios de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.....	105
II. Composición de medios de cultivo, soluciones, <i>buffer</i> y geles de agarosa.....	108
II. Electroforesis en geles de poliacríamida.....	111
III. Comunicaciones a Congresos y Publicaciones.....	114

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados para la amplificación de los 6 marcadores incluidos en el LSPA-6 y tamaño de los productos de amplificación en los distintos linajes.....	20
Tabla 2.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar las secuencias <i>target</i> del LSPA-6.....	20
Tabla 3.	Perfiles genéticos y linajes LSPA-6 de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.....	21
Tabla 4.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño del producto amplificado para la identificación de cepas pertenecientes al clado 8.....	25
Tabla 5.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar <i>rhsA</i>	25
Tabla 6.	Condiciones de digestión con enzimas de restricción y fragmentos generados.....	25
Tabla 7.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño del producto amplificado para la identificación del SNP en la posición 255 del gen <i>tir</i> (<i>tir</i> 255 T>A)....	28
Tabla 8.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar <i>tir</i>	28
Tabla 9.	Alelos <i>tir</i> 255 T>A en los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.....	29
Tabla 10.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño aproximado del producto amplificado para cada VNTR en el MLVA.....	33
Tabla 11.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar los VNTR.....	33
Tabla 12.	Distribución de alelos para cada <i>locus</i> VNTR y para cada aislamiento VTEC O157:H7.....	34
Tabla 13.	Caracterización de los <i>loci</i> VNTR estudiados	35
Tabla 14.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño de productos amplificados para la determinación de grupos filogenéticos.....	39
Tabla 15.	Condiciones de termociclado utilizadas para la determinación de grupos filogenéticos.....	39
Tabla 16.	Genotipos cuádruples y asignación a grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	40
Tabla 17.	Perfiles obtenidos y grupos filogenéticos asignados de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.....	41
Tabla 18.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño de los productos amplificados para la identificación de genes codificantes de factores putativos de virulencia.....	46
Tabla 19.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar genes codificantes de factores putativos de virulencia.....	46
Tabla 20.	Distribución de genes codificantes de factores putativos de virulencia en los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.....	47
Tabla 21.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño de los productos amplificados para la identificación de genes plasmídicos que codifican factores de virulencia.....	53
Tabla 22.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar genes plasmídicos codificantes de factores de virulencia.....	53
Tabla 23.	Genes de virulencia codificados en las islas de patogenicidad (PAI) estudiadas.....	56
Tabla 24.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño de los productos amplificados para la identificación de genes de virulencia ubicados en islas de patogenicidad.....	57
Tabla 25.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar los genes de virulencia presentes en islas de patogenicidad estudiadas.....	58

Tabla 26.	Distribución de genes <i>nle</i> en los aislamientos O157:H7 estudiados.....	59
Tabla 27.	Secuencias de los <i>primers</i> empleados y tamaño de los productos amplificados para la identificación de genes que codifican factores de adherencia.....	65
Tabla 28.	Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar genes que codifican factores de adherencia.....	65
Tabla 29.	Resultados del ensayo de citotoxicidad de aislamientos VTEC O157:H7.....	68
Tabla 30.	Distribución y asociación de subtipos de VTEC O157:H7 de acuerdo al origen de los aislamientos estudiados.....	73
Tabla 31.	Distribución y asociación de factores de virulencia de acuerdo al origen de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.....	74
Tabla 32.	Distribución y asociación de factores de virulencia entre los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados de origen humano según hayan o no causado SUH.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Vías de transmisión de VTEC.....	7
Figura 2.	Lesión de “adherencia y borrado” (AE).....	9
Figura 3.	Patogénesis de VTEC sobre las células epiteliales del colon humano.....	10
Figura 4.	Distribución de perfiles genéticos obtenidos por MLVA, sin discriminar los perfiles únicos.....	35
Figura 5.	Dendrograma de aislamientos VTEC O157:H7, construido por UPGMA, en base a sus perfiles MLVA	36
Figura 6.	Distribución de genes codificantes de factores putativos de virulencia de acuerdo al origen de los aislamientos VTEC O157:H7.....	48
Figura 7.	Análisis de agrupamiento (MST) de los aislamientos VTEC O157:H7, basado en los 6 genes que codifican factores putativos de virulencia.....	49
Figura 8.	Distribución de genes <i>nle</i> en las diferentes islas de acuerdo al origen de los aislamientos.....	61
Figura 9.	Análisis de agrupamiento (MST) de los aislamientos VTEC O157:H7, basado en 16 genes <i>nle</i>	62
Figura 10.	Efecto citotóxico de aislamientos VTEC O157:H7 de Argentina discriminado por origen (en %)......	69
Figura 11.	Análisis de agrupamiento por UPGMA de aislamientos VTEC O157:H7 en base a perfiles de MLVA.....	75

Introducción

Escherichia coli verotoxigénico (VTEC) representa un grupo importante de patógenos que puede causar severas enfermedades en los seres humanos, tales como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Karmali, 1989; Paton y Paton, 1998), afectando principalmente a niños menores de 5 años (Rivas *et al.*, 2006). En Argentina el SUH alcanza la mayor incidencia a nivel mundial (más de 500 casos/año), es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños y una de las más importantes de insuficiencia renal crónica (Ferraris *et al.*, 2002; Cobeñas *et al.*, 2007). Existen numerosos serotipos, siendo O157:H7 el serotipo involucrado en la mayoría de los casos de enfermedad en el mundo, y en Argentina, también el más frecuentemente asociado al SUH (Rivas *et al.*, 2008). Sin embargo no todos los aislamientos de O157:H7 tienen la misma capacidad de infectar y de causar enfermedad en el hombre (Mead y Griffin, 1998).

Las cepas VTEC se encuentran en la flora intestinal de animales domésticos y el bovino es el principal reservorio. El contagio al hombre puede ser consecuencia, principalmente, de la ingesta de alimentos cárnicos deficientemente cocidos y productos lácteos sin pasteurizar (Rivero *et al.*, 2010; Caprioli *et al.*, 2005). En Argentina existe una alta prevalencia de VTEC en bovinos, así como en una alta proporción de alimentos (Sanz *et al.*, 1998; Parma *et al.*, 2000; Padola *et al.*, 2004; Mercado *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2009; Masana *et al.*, 2010).

En relación a O157:H7, mediante el análisis comparativo de genomas, se han descripto varios métodos de genotipado molecular los cuales analizan distintas regiones y tipos de variación en el ADN. La combinación de los datos obtenidos puede ofrecer una visión más amplia y robusta sobre la estructura poblacional y la diversidad genética de este serotipo. Estudios filogenéticos determinaron que estas cepas integran subpoblaciones de dispersión mundial, las cuales diferirían en relación a su asociación con enfermedad en humanos, poseyendo distintos tipo y nivel de expresión de factores de virulencia (Kim *et al.*, 1999; 2001; Yang *et al.*, 2004).

Los estudios de comparación genómica junto con la evaluación del contenido de las islas de patogenicidad y la identificación de los genes de virulencia que estas islas codifican han ofrecido una nueva herramienta que permite determinar el potencial riesgo para la salud pública asociado a las cepas de VTEC. Basándose en esto último, Coombes *et al.* (2008) han propuesto el concepto de evaluación de riesgo molecular o MRA (*Molecular Risk Assessment*) como estrategia para identificar cepas VTEC que poseen un alto riesgo para la salud pública.

Hipótesis

Por todo lo expuesto, especialmente debido a que i) O157:H7 es el serotipo involucrado en la mayoría de los casos de enfermedad en el mundo y, particularmente en Argentina, el más frecuentemente asociado al SUH, ii) no todas las cepas VTEC O157:H7 tienen la misma capacidad de infectar, nos propusimos aportar datos sobre la diversidad genética de O157:H7, e identificar las características de virulencia presentes en los aislamientos. Esta información permitirá conocer la estructura de la población local y mejorar la identificación de las cepas O157:H7 que están circulando en la región pampeana.

La hipótesis de esta tesis es que en la región pampeana de Argentina están circulando cepas VTEC con distintas características genéticas y que algunas de ellas son hipervirulentas. Nos planteamos tratar de probar esta hipótesis utilizando distintas metodologías tales como estudios de polimorfismos específicos de linaje (LSPA-6), subtipificación mediante polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA), asignación de filogrupos, análisis de la distribución de genes que codifican factores putativos de virulencia (FPV), de genes de virulencia ubicados en plásmidos, en islas de patogenicidad que codifican efectores del sistema de secreción tipo III, codificantes de adhesinas y análisis de citotoxicidad.

Objetivos

Objetivo general

Conocer la diversidad genética de *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7 de nuestro país, en particular de aquellas cepas que están circulando en la región pampeana, e identificar subtipos asociados a patogenicidad y virulencia con el fin de contribuir al conocimiento del riesgo que representan para la salud pública.

Objetivos específicos

- Subtipificar aislamientos VTEC O157:H7 nativos mediante análisis de polimorfismos específicos de Linaje (LSPA-6), análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP), análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA) y determinación de grupos filogenéticos.
- Analizar la distribución de genes codificantes de factores putativos de virulencia (FPV), de genes plasmídicos que codifican factores de virulencia, de genes ubicados en islas de patogenicidad (OI-36, OI-57, OI-71 y OI-122) que codifican efectores del sistema de secreción tipo III y de genes que codifican factores de adherencia en aislamientos VTEC O157:H7.
- Evaluar la citotoxicidad de aislamientos VTEC O157:H7.
- Realizar un análisis comparativo de los aislamientos estudiados, teniendo en cuenta los múltiples caracteres analizados para identificar si existe algún tipo de asociación entre ellos y las cepas provenientes de bovinos y de casos clínicos, y si se diferencian subpoblaciones.

CAPÍTULO I: CONOCIMIENTO ACTUAL SOBRE LA TEMÁTICA

1.1 *Escherichia coli* verotoxigénico

Escherichia coli (*E. coli*) es un bacilo gram negativo que forma parte de la flora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, siendo el organismo anaerobio facultativo más común del colon. *E. coli* y su hospedador se relacionan de manera simbiótica, aunque se han reconocido cepas patógenas de importancia en clínica humana y veterinaria, causantes de un amplio espectro de enfermedades (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

Kauffmann (1947) propuso un esquema antigénico de clasificación para *E. coli*, basado en 3 tipos de antígenos de superficie: O (somático), H (flagelar) y K (capsular), el cual permite asignar serogrupos y serotipos.

La mayoría de las cepas de *E. coli* no son patógenas, sin embargo distintas cepas han adquirido factores de virulencia específicos que les confieren habilidad para adaptarse a nuevos nichos y les permiten causar un amplio espectro de enfermedades. Estos factores se codifican con frecuencia en elementos genéticos móviles. Solo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido para convertirse en patotipos específicos de *E. coli* que son capaces de causar enfermedades en individuos sanos (Kaper *et al.*, 2004).

Las cepas de *E. coli* asociadas con infecciones gastrointestinales se pueden clasificar, al menos, en seis patotipos, los cuales causan enfermedad por diferentes mecanismos: *E. coli* enteropatogénico (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* verotoxigénico (VTEC), del cual *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) es un subgrupo, *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAaggEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Bettelheim, 2007).

VTEC constituye un importante grupo de patógenos emergentes de origen zoonótico, capaz de causar patologías muy severas en el hombre, tales como colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Karmali, 1989; Paton y Paton, 1998).

1.2 Síndrome urémico hemolítico (SUH)

La infección por VTEC puede provocar diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta o SUH. El SUH es una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) que afecta principalmente a niños menores de 5 años (Belardo, 2014), y se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (Gianantonio *et al.*, 1973; Mele *et al.*, 2014). Los riñones son los principales órganos afectados, junto al sistema nervioso central, los pulmones, el páncreas y el corazón (Gyles, 2007).

VTEC causa en el mundo más de 2,8 millones de enfermedades agudas al año, con 3890 casos de SUH, 270 casos de enfermedad renal en etapa terminal y 230 muertes (Majowicz *et al.*, 2015).

En Argentina, el SUH es endémico convirtiéndose en un problema de salud pública (Belardo, 2014). Se reportan aproximadamente 500 casos de SUH al año, con una incidencia 10 veces mayor que cualquier otro país industrializado, de entre 7,8 y el 17 por cada 100 mil niños menores de cinco años, y una letalidad del 2 al 5 % (Rivas *et al.*, 2010). El SUH constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños y la segunda de insuficiencia renal crónica (Spizzirri *et al.*, 1997; Ferraris *et al.*, 2002; Cobeñas *et al.*, 2007).

1.3 Reservorios y vías de transmisión de VTEC

Los rumiantes, en particular los bovinos, son el principal reservorio de VTEC, y los alimentos y aguas contaminados las principales vías de transmisión al hombre (Karmali *et al.*, 2003; Caprioli *et al.*, 2005). En particular, la carne es contaminada durante la faena de los animales en el frigorífico y la falta de higiene puede provocar la contaminación de la leche durante el ordeño (Blanco *et al.*, 1996). VTEC puede afectar al hombre en cualquier punto de la cadena productiva debido a su capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles y/o a su dosis infectiva muy baja (Todd y Dundas, 2001). Menos de 100 bacterias por gramo de alimento pueden producir enfermedad (Kaper *et al.*, 2004).

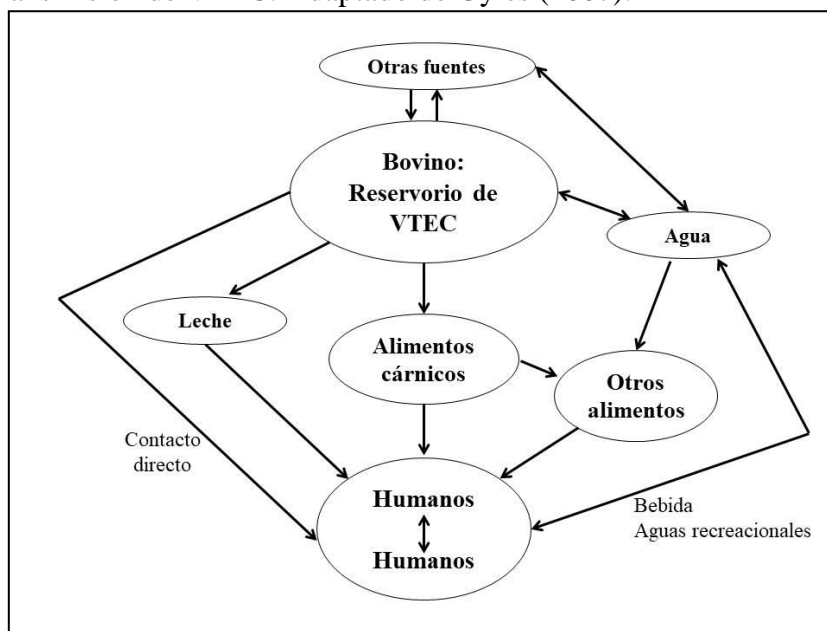
Las vías de transmisión de este patógeno incluyen carne picada, hamburguesas y otros productos cárnicos mal cocidos, embutidos fermentados, leche cruda, queso, sidra y jugos sin pasteurizar, lechuga, melón, brotes de alfalfa, brotes de rábano, agua potable, aguas recreacionales y el contacto con animales. La transmisión también puede ocurrir persona a persona (Figura 1) (Gyles, 2007). Los brotes de VTEC fueron asociados históricamente al consumo de hamburguesas mal cocidas, sin embargo en la actualidad las infecciones por VTEC se asocian al consumo de un gran número de alimentos (Kaper *et al.*, 2004), principalmente aquellos alimentos listos para el consumo (RTE- *Ready To Eat food*), incluidas las frutas y hortalizas frescas (Torres *et al.*, 2018).

A nivel mundial la epidemiología de las infecciones por VTEC ha cambiado notablemente durante los últimos años y ha aparecido un número creciente de vehículos alimentarios inusuales. Un ejemplo de ello es el último gran brote causado por una cepa VTEC

atípica, que comenzó en el norte de Alemania y se extendió a 15 países en 2011, generado a partir del consumo de brotes de fenogreco contaminados con VTEC O104:H4 (Blaser, 2011).

En Argentina, existe una alta prevalencia de VTEC en bovinos alimentados a pastoreo y a corral, así como una alta proporción de alimentos derivados contaminados con estas cepas (Sanz *et al.*, 1998; Parma *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2002; Padola *et al.*, 2004; Masana *et al.*, 2010).

Figura 1. Vías de transmisión de VTEC. Adaptado de Gyles (2007).



1.4 Factores de virulencia de VTEC

VTEC se caracteriza por la producción de citotoxinas que inhiben la síntesis proteica en células eucariontes. Estas toxinas se denominan verotoxinas (Vtx) debido a su actividad citotóxica sobre las células de la línea Vero, o toxinas Shiga (Stx), por su similitud con las sintetizadas por *Shigella dysenteriae*. Por ello, a este patotipo se lo conoce también como STEC o *E. coli* productor de toxinas Shiga (Caprioli *et al.*, 2005). Estos factores de virulencia codificados en bacteriófagos integrados al genoma de la bacteria son críticos en el desarrollo del SUH (Karmali, 1989; Paton y Paton, 1998). Una vez que las Vtx ingresan al torrente sanguíneo pueden desencadenar el SUH (Gianantonio *et al.*, 1973). El ensayo de citotoxicidad en la línea celular Vero es utilizado como método estándar para la titulación de las Vtx y la evaluación de sus efectos citotóxicos (Konowalchuk *et al.*, 1977).

Además, se ha descrito un número creciente de factores de virulencia adicionales, muchos de los cuales se encuentran codificados en otros elementos genéticos móviles o MGE

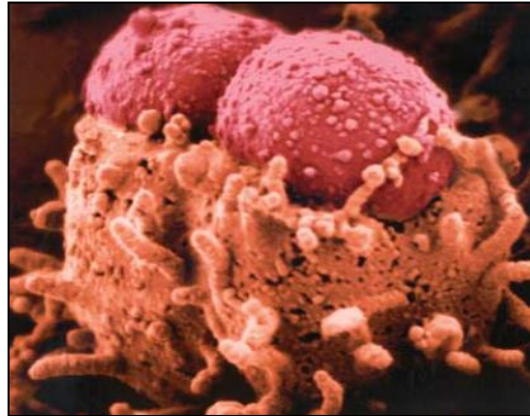
(*Mobile Genetic Elements*), como islas de patogenicidad (PAI) y plásmidos (Caprioli *et al.*, 2005).

Algunas VTEC tienen la capacidad de colonizar la mucosa intestinal mediante un mecanismo de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de la célula intestinal, que da lugar a la lesión característica de “adherencia y borrado” (AE- *Attaching and Effacing Lesion*) (Figura 2). Ésta implica cambios estructurales en la célula epitelial, como pérdida de microvellosidades, formación de pedestal y acumulación de proteínas del citoesqueleto debajo de las bacterias adheridas (Gyles, 2007).

La información genética para el desarrollo de la lesión AE está codificada en una isla de patogenicidad (PAI) cromosómica llamada *Locus* de Borrado del Enterocito (LEE - *Locus of Enterocyte Effacement*) (McDaniel *et al.*, 1995; McDaniel y Kaper, 1997). La isla LEE se encuentra organizada en 5 operones policistrónicos (LEE1 a LEE5) que codifican para un sistema de secreción de tipo III (SST3), un sistema de translocación de proteínas y un sistema de adherencia, además de otras proteínas efectoras que son translocadas por el SST3 (Gyles, 2007). La adherencia a las células del epitelio intestinal es mediada por una proteína de membrana externa, llamada intimina, codificada por el gen *eae*, y su receptor translocado (Tir- *translocated intimin receptor*), codificado por el gen *tir*. La proteína Tir es translocada por el SST3 e insertada en la membrana de la célula huésped donde actúa como receptor para la intimina de la membrana externa de la bacteria. El SST3 inyecta, además, otras proteínas efectoras desde el citoplasma bacteriano a la célula epitelial intestinal del huésped (Kaper *et al.*, 2004; Gyles, 2007).

Otros factores de virulencia adicionales están codificados en megaplásmidos, como una adhesina autoaglutinante, Saa, involucrada en la colonización de la mucosa intestinal del huésped (Paton *et al.*, 2001), una proteína con actividad hemolítica, EhxA (Schmidt *et al.*, 1995), una catalasa peroxidasa (KatP), una serina proteasa (EspP), una metaloproteasa (StcE), una citotoxina subtilasa (SubAB) y otra adhesina (Sab) (Brunner *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1997; Lathem *et al.*, 2002; Paton *et al.*, 2004; Herold *et al.*, 2009).

Figura 2. Lesión de “adherencia y borrado” (AE). Se observan los cambios estructurales en las células epiteliales, similares a pedestales, sobre los que se posan las bacterias (Kaper *et al.*, 2004).

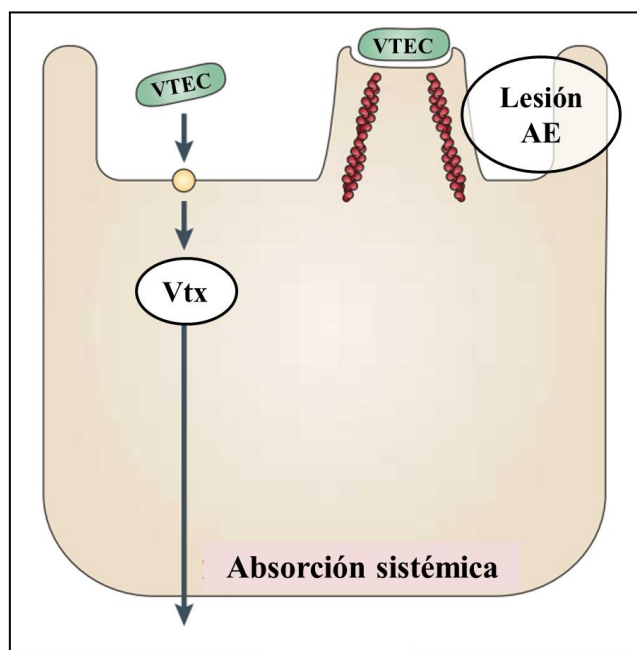


1.5 Patogénesis de VTEC

El mecanismo de patogénesis de VTEC consiste, básicamente, en la colonización del intestino y la producción de daño al hospedador debido a la producción de toxinas (Figura 3), involucrando múltiples procesos y una compleja interacción entre factores bacterianos y del hospedador (Rivas *et al.*, 2010), que aún no se encuentran completamente dilucidados.

La colonización es el proceso mediante el cual VTEC sobrepasa las barreras de defensa del hospedador y se establece en el intestino, adhiriéndose a los enterocitos sin invadirlos. Posteriormente, VTEC puede producir la lesión AE, que provoca el borrado de las microvellosidades y, consecuentemente, diarrea. Si se produce suficiente Vtx, el daño de los vasos sanguíneos del cólon produce diarrea sanguinolenta. Si se absorbe suficiente Vtx en el sistema circulatorio, se dañan otros sitios endoteliales que presentan el receptor afin a la toxina, los riñones y el sistema nervioso central principalmente, pudiendo desarrollarse SUH (Gyles, 2007).

Figura 3. Patogénesis de VTEC sobre las células epiteliales del colon humano. Adaptado de Kaper y colaboradores (2004).



1.6 VTEC O157:H7

Si bien existen más de 150 serotipos VTEC que son potencialmente patogénicos, O157:H7 es el serotipo más frecuentemente aislado de casos de enfermedad en el mundo y al que se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes (Rivas *et al.*, 2008). VTEC O157:H7 se identificó por primera vez como patógeno transmitido por los alimentos luego de dos brotes ocurridos en EE.UU. en 1982 (Riley *et al.*, 1983). El serotipo O157:H7 es móvil, no fermenta el sorbitol, en general no expresa actividad de β -glucuronidasa (Bono *et al.*, 2007).

Las notificaciones de las infecciones por *E. coli* O157:H7 experimentaron un aumento exponencial a partir de su primera descripción (Rangel *et al.*, 2005). Su emergencia generó una gran preocupación a nivel mundial por el número de personas afectadas y por los distintos vehículos de transmisión identificados (carne, vegetales, alimentos ácidos, aguas de consumo y recreación, entre otros) (Rivas *et al.*, 2008).

VTEC O157:H7 ha causado numerosos brotes en las últimas décadas, con una amplia gama de manifestaciones clínicas (Manning *et al.*, 2008). El primer brote, ocurrido en 1982, involucró al menos 47 casos de diarrea en EE.UU., y estuvo asociado con el consumo de hamburguesas de carne mal cocidas en restaurantes de comida rápida (Riley *et al.*, 1983). En 1993, en un brote asociado también al consumo de hamburguesas en EE.UU., se reportaron 501

casos de diarrea, 151 hospitalizaciones (31 %), 45 casos de SUH (9 %) y tres muertes (Bell *et al.*, 1994). En 1996 ocurrió un brote masivo asociado con el consumo de brotes de rábano blanco en Sakai, Japón. Afectó a 7470 niños en edad escolar, ocurrieron 1000 hospitalizaciones con síntomas gastrointestinales graves, 100 casos de SUH y tres muertes (Michino *et al.*, 1999). En China, en 1999, ocurrió otro brote masivo pero menos conocido asociado al contacto con animales infectados, con 195 pacientes hospitalizados con SUH, la mayoría mayores de 50 años (85.6 %), de los cuales el 90 % murió (177) (Xiong *et al.*, 2012). En 2006, un brote asociado al consumo de espinacas afectó a 205 personas de diversos estados de EE.UU., presentando altas tasas de hospitalizaciones (50 %) y de SUH (16 %) (Grant *et al.*, 2008). En 2014, en Inglaterra se identificó un brote de O157:H7 asociado al consumo de RTE, donde se registraron 102 casos de enfermedad, en su mayoría mujeres con una edad media de 49 años, y 34 hospitalizaciones (33 %), no fueron diagnosticados casos de SUH (Sinclair *et al.*, 2017). En 2015, en Washington, EE.UU., ocurrió un brote por VTEC O157:H7 luego de una excursión escolar, asociado al consumo de productos lácteos; donde se registraron 60 personas enfermas, de menos de un año a 47 años de edad; 11 hospitalizaciones (18 %) y 6 casos de SUH (10 %) (Curran *et al.*, 2017). En 2016, Kanagawa, Japón, fue registrado un brote de VTEC O157:H7 asociado al consumo de hamburguesas de carne molida vendidas crudas por una cadena de supermercados. Se confirmaron un total de 61 personas afectadas, mayormente de entre 5 a 14 años, 24 hospitalizaciones (39 %) y 4 casos de SUH (6,5 %) (Furukawa *et al.*, 2018).

En Argentina, el serotipo O157:H7 también es el más frecuentemente asociado al SUH, representa el 60 % de los casos de SUH reportados (Guth *et al.*, 2010). Sin embargo, no se producen brotes de ETA asociados a infecciones con VTEC O157:H7. La presentación es en forma de casos esporádicos o brotes difusos de difícil definición epidemiológica (Rivas *et al.*, 2006).

No todos los aislamientos de VTEC O157:H7 tienen la misma capacidad de infectar y de causar enfermedad en el hombre (Mead y Griffin, 1998) y los factores que contribuyen a la variación en la gravedad de la enfermedad son poco conocidos (Manning *et al.*, 2008). Los últimos brotes relacionados al consumo de productos frescos contaminados con VTEC O157:H7 fueron asociados con enfermedad más grave, por mayor frecuencia de hospitalización y por un alto número de casos de SUH, lo que sugiere un aumento en la virulencia de este patógeno (Manning *et al.*, 2008). El surgimiento en las últimas décadas, de clones VTEC O157:H7 hipervirulentos de distribución mundial (Rivas *et al.*, 2016) es una clara evidencia de la dinámica genómica que posee este grupo de patógenos y de su capacidad para transferir o adquirir factores de virulencia (Torres *et al.*, 2018).

1.7 Subtipificación molecular de VTEC O157:H7

Estudios filogenéticos determinaron que las cepas O157:H7 integran subpoblaciones de dispersión mundial, las cuales diferirían en relación a su asociación con enfermedad en humanos, poseyendo distintos tipo y nivel de expresión de los factores de virulencia (Kim *et al.*, 1999; 2001; Yang *et al.*, 2004). Mediante el análisis comparativo de genomas, se han descrito varios métodos de subtipificación molecular, los cuales analizan diversidad nucleotídica en distintas regiones del ADN, tales como polimorfismos específicos de linaje (LSPA-6), polimorfismos de nucleótido simple (SNP), análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA) y determinación de grupos filogenéticos. Estos marcadores moleculares comprenden regiones del genoma con tasas de mutación características para cada una, lo que permite analizar la diversidad genética en diferentes escalas temporales.

El análisis de polimorfismos específicos de linaje (LSPA-6) es un método que permite caracterizar a los aislamientos en base a polimorfismos presentes en seis marcadores genéticos (Yang *et al.*, 2004). Mediante este análisis, primeramente, se propuso dividir a la población VTEC O157:H7 en dos linajes filogenéticos primarios, denominados linaje I y linaje II, los cuales tendrían diferencias en cuanto a su propensión a causar enfermedad o a ser transmitidos a humanos (Kim *et al.*, 1999; 2001). En estudios posteriores se describió un tercer linaje, designado linaje I/II (Ziebell *et al.*, 2008). Las cepas pertenecientes al linaje I se identifican con mayor frecuencia en muestras de ganado y humanos, el linaje II comprende predominantemente cepas de origen bovino y cepas no patogénicas derivadas de humanos. El linaje intermedio I/II se encuentra menos caracterizado con respecto al fenotipo y la distribución en el huésped (Ziebell *et al.*, 2008; Laing *et al.*, 2009; Hartzell *et al.*, 2011).

Manning y colaboradores (2008) desarrollaron un esquema que detecta 96 polimorfismos de nucleótido simple (SNP) y permite agrupar a las cepas O157:H7 en 9 clados evolutivos. Los aislamientos del clado 8 son más virulentos que los demás. Se ha sugerido que la adquisición de nuevos factores de virulencia y la sobreexpresión de otros explicarían la mayor gravedad de la enfermedad causada por cepas pertenecientes a este clado (McDaniel *et al.*, 1995; Abu-Ali *et al.*, 2010; Neupane *et al.*, 2011). Particularmente, para identificar las cepas pertenecientes al clado 8, Franz y colaboradores (2012) propusieron un ensayo de RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción- *Restriction Fragment Length Polymorphism*), dirigido a un SNP del gen *rhsA* (SNP posición 3468). Por otro lado, Bono y colaboradores (2007) describieron un SNP presente en la posición 255 del gen *tir* (*tir* 255 T>A) que permite distinguir subtipos de VTEC

O157:H7 asociados al reservorio bovino de aquellos asociados a una incrementada virulencia en humanos.

El análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA, *Multiple Loci VNTR Analysis*) permite establecer relaciones genéticas entre cepas bacterianas estrechamente relacionadas (Keim *et al.*, 2000; Noller *et al.*, 2003; Lindstedt, 2005). Se han desarrollado protocolos específicos en relación a la subtipificación molecular del serotipo O157:H7 mediante MLVA (Keys *et al.*, 2005; Noller *et al.*, 2003; Lindstedt *et al.*, 2003; 2004; 2007).

Estudios filogenéticos sobre el origen evolutivo de *E. coli* patógeno han demostrado que las cepas de *E. coli* pueden clasificarse filogeneticamente en 4 grupos principales: A, B1, B2 y D, y a su vez, dichos grupos filogenéticos pueden subdividirse en 7 subgrupos (A, B1, B2, C, D, E y F) permitiendo incrementar el poder de discriminación del análisis de la población de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2013).

Es importante disponer de una caracterización molecular de las cepas VTEC O157:H7 circulantes en la región, que permita conocer la diversidad genética existente y compararla con la de otras regiones geográficas.

1.8 Genes codificantes de factores de virulencia en VTEC O157:H7

La evidencia epidemiológica sugiere que el potencial de *E. coli* O157:H7 para causar SUH se debe principalmente a la presencia de Vtx (codificadas por el gen *vtx*) o a la presencia de Vtx más la intimina (codificada por el gen *eae*) (Kaper *et al.*, 2004). Sin embargo, Kulasekara y colaboradores (2009) identificaron siete determinantes de virulencia supuestos o putativos, en el genoma de una cepa responsable de un brote de SUH asociado al consumo de espinaca en el año 2006 en EE.UU. (TW14359). Estas secuencias codificantes se encuentran relacionadas con dos proteínas efectoras del SST3, genes candidatos que podrían contribuir a un aumento de la patogenicidad o, alternativamente, adaptación a vegetales y un gen que codifica una óxido nítrico- reductasa.

Otras propiedades importantes de virulencia están codificadas en MGE, tales como plásmidos y PAI. La mayoría de los aislamientos clínicos de VTEC O157:H7 poseen un gran plásmido, llamado plásmido enterohemorrágico (pO157) (Schmidt *et al.*, 1996; Burland *et al.*, 1998). Entre aquellos factores de virulencia codificados en plásmidos, se distinguen: una proteína con actividad hemolítica, EhxA (Schmidt *et al.*, 1995), una catalasa peroxidasa (KatP),

serina proteasas (EpeA y EspP), una metaloproteasa de zinc (StcE), entre otros (Brunder *et al.*, 1996; 1997; Lathem *et al.*, 2002; Leyton *et al.*, 2003; Paton *et al.*, 2004).

La PAI más estudiada, el LEE, rige la capacidad de VTEC para colonizar la mucosa intestinal del huésped (Manning *et al.*, 2008; Masana *et al.*, 2010). Otras PAI, denominadas islas O (OI), contienen genes efectores *nle* (*non LEE effectors*) que codifican sustratos translocados por el SST3 (Coombes *et al.* 2008; Bugarel *et al.*, 2010; Konczy *et al.*, 2008). Algunos de estos efectores contribuyen a la colonización y persistencia de VTEC en el ganado e interfieren en la respuesta inflamatoria del ser humano (Dziva *et al.*, 2004; van Diemen *et al.*, 2005). En el contexto de MRA, se ha propuesto el análisis de genes codificados en PAI para distinguir cepas altamente virulentas de aquellas menos virulentas (Cadona *et al.*, 2018).

Por otra parte, han sido descriptos en cepas O157:H7, determinantes adicionales de virulencia, de adherencia y de colonización. Entre ellos, Lpf, la fimbria polar larga, un importante factor de colonización y de adherencia en células (Torres *et al.*, 2002; 2004; 2008); EhaA, una proteína autotransportadora (AT) implicada en la adhesión y formación de biopelículas (Wells *et al.*, 2008); una fimbria de unión a laminilla de *E. coli* (ELF) que media la adherencia a las células intestinales humanas (Hernandes *et al.*, 2011) e Iha, una adhesina homóloga a IrgA de *Vibrio cholerae* (Szalo *et al.*, 2002).

El análisis del potencial patogénico de cepas de ganado, y su comparación con cepas de casos clínicos, es fundamental para una mejor comprensión de las diferencias regionales en cuanto a la incidencia y gravedad de la enfermedad en humanos (Torres *et al.*, 2018).

CAPÍTULO II: SECCIONES EXPERIMENTALES

2.1 Aislamientos bacterianos

Se analizaron 43 aislamientos VTEC O157:H7 obtenidos de seres humanos (n=23), bovinos (n=19) y alimentos cárnicos (n=1) de la región pampeana de Argentina, entre 1996 y 2014, disponibles en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, FCV-UNCPBA (Anexo I). Los aislamientos fueron previamente caracterizados en relación a genes codificantes de factores de virulencia: Vtx 1 y 2 (*vtx₁* y *vtx₂*), intimina (*eae*), enterohemolisina (*ehxA*), y adhesina autoaglutinante (*saa*) (Padola *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2009; 2012; Rivero *et al.*, 2010; Sanz, datos no publicados). La totalidad de los aislamientos presentó el perfil: *vtx₂*, *eae*, *ehxA*.

2.2 Cepas de referencia

Para la asignación a subtipos y detección de factores de virulencia adicionales se utilizaron las siguientes cepas de referencia:

- EDL 933 (VTEC O157:H7 *vtx₁*, *vtx₂*, *eae*, *ehxA*, *chuA*, clado 3, Linaje LSPA-6 I) proveniente del Servicio de Fisiopatogenia ANLIS- Malbrán, República Argentina.
- K12 (cepa de referencia utilizada en LSPA-6).
- Anguil 9.1 y VAC 07-2 (VTEC O157:H7 *vtx₂*, *eae*, *ehxA*, clado 8) proporcionadas por el Dr. A. Cataldi, Instituto de Biotecnología, CICVyA, Argentina.
- FB 94 (VTEC O103:H2 *arpa* y TspE4.C2+), L2O1 (EPEC O39:H40 *yjaA*) y AP 28-1 (VTEC O20:H19 *espP*, *ehxA*, *suba*, *epeA*) pertenecientes al Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, FCV-UNCPBA.

2.3 Obtención de ADN

Para la obtención del ADN se extrajeron alícuotas de los cultivos congelados y se colocaron en 500 µl de agua bidestilada, llevándose a ebullición durante 10 min.

SECCIÓN EXPERIMENTAL I:

Subtipificación molecular de aislamientos nativos VTEC O157:H7

2.4 Objetivo: Subtipificar aislamientos VTEC O157:H7 nativos mediante análisis de polimorfismos específicos de linaje (LSPA-6), análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) específicos del clado 8 y del polimorfismo A/T en el gen *tir*, análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA) y detección de grupos filogenéticos.

2.4.1 Análisis de polimorfismos específicos de linaje (LSPA-6)

Introducción:

La genotipificación por métodos de alta resolución de cepas de *E. coli* O157:H7 mediante barrido genómico basado en octámeros -*octamer-based genome scanning* (OBGS)- demostró por primera vez que *E. coli* O157:H7 divergió en dos linajes primarios, designados como linaje I, y linaje II (Kim *et al.*, 1999; 2001). Estos linajes se encuentran distribuidos de manera sesgada en diferentes huéspedes (Kim *et al.*, 1999) y en distintas regiones geográficas (Mellor *et al.*, 2015). Numerosos estudios han demostrado esta marcada diferencia en cuanto a la distribución de linajes entre cepas de origen humano y cepas obtenidas del reservorio bovino (Whitworth *et al.*, 2010; Franz *et al.*, 2012). El linaje I es identificado con mayor frecuencia en aislamientos de muestras de humanos, mientras que el linaje II se encuentra altamente asociado con aislamientos de bovinos (Ziebell *et al.*, 2008).

La distribución no aleatoria de aislamientos VTEC O157:H7 provenientes de humanos y bovinos, entre los linajes sugiere que las cepas del linaje II podrían no causar fácilmente enfermedad o no podrían transmitirse fácilmente al hombre a partir de fuentes bovinas. Este hallazgo podría reflejar la adquisición o pérdida de alguna característica de virulencia (Kim *et al.*, 1999).

Posteriormente fue identificado el linaje I/II intermedio (Zhang *et al.*, 2007), menos caracterizado, especialmente en relación al hospedador.

Yang y colaboradores (2004) desarrollaron un ensayo de PCR múltiple, denominado análisis de polimorfismos específicos de linaje -*Lineage Specific Polymorphism Assay* (LSPA-6), el cual permite identificar el linaje al que pertenece un aislamiento VTEC O157:H7 mediante el análisis de polimorfismos presentes en 6 marcadores.

Materiales y métodos:

La tipificación por LSPA-6 se realizó mediante dos reacciones de PCR múltiples y dos simples, utilizando los *primers* que se detallan en la Tabla 1. Una de las reacciones de PCR múltiple incluyó la amplificación de *yhcG* y *rtcB* y la otra, de *arp-iclR* y *rbsB*. En las reacciones simples se utilizaron los *primers* *fold-sfmA* y *Z5935*.

Los cócteles para las reacciones múltiples incluyeron solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 pmol de cada *primer*, 1 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Los cócteles para las reacciones simples incluyeron solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmol de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 μ l de extracto de ADN, en un volumen final de 25 μ l.

Las condiciones de termociclado que se implementaron en cada PCR para la detección de las 6 secuencias, se obtuvieron a partir de la puesta a punto correspondiente y se detallan en la Tabla 2.

Las reacciones de PCR se efectuaron en dos cicladores térmicos programables: *T-17 Ivema* y *Multigene Optimax*. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 %, teñidos con bromuro de etidio. Se sembraron 8 μ l de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 45 minutos en *buffer* TBE 1x. La visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV.

El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway), que consta de 10 fragmentos de ADN de doble hebra de tamaño molecular 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 pb, de los cuales la banda de 500 pb contiene el triple de concentración molar que el resto y sirve como un visible indicador de referencia.

Los alelos característicos de cada linaje se identificaron en cepas de referencia, K12 y EDL 933. Los perfiles se generan como códigos binarios de 6 dígitos. Los aislamientos con genotipo 111111 se clasificaron como linaje I, 211111 como linaje I/II y todas las desviaciones de esos genotipos, como linaje II.

Las variantes alélicas identificadas para cada marcador fueron confirmadas mediante secuenciación en un analizador ABI PRISM 3730XL (MacroGen, Inc, Corea). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software Chromas 2.32 (Technelysium Pty. Ltd.), y se alinearon con el software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) frente a cepas de referencia.

Resultados:

Un total de 42 aislamientos mostraron el perfil LSPA-6 211111, perteneciente al linaje I/II (98 %). Sólo un aislamiento obtenido de humano (N° 28) presentó el perfil LSPA-6 221211, característico del linaje II (Tabla 3).

Tabla 1. Secuencias de los *primers* empleados para la amplificación de los 6 marcadores incluidos en el LSPA-6 y tamaño de los productos de amplificación en los distintos linajes. Adaptado de Yang y colaboradores, 2004.

<i>Target</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	Tamaño de los distintos alelos (pb)	
		Linaje I	Linaje II
<i>fold-sfmA</i>	fw -TACGTAGGTCGAAGGG rv -CCAGATTTACAACGCC	161	170
<i>Z5935</i>	fw -GTGTTCCCGGTATTTG rv -CTCACTGGCGTAACCT	133	142
<i>yhG</i>	fw -CTCTGCAAAAACTTACGCC rv -CAGGTGGTTGATCAGCG	394	472
<i>rtcB</i>	fw -GCGCCAGATCGATAAAGTAAG rv -GCCGTTGTAAACGTGATAAAG	218	209/214
<i>rbsB</i>	fw -AGTTTAATGTTCTTGCCAGCC rv -ATTCACCGCTTTTTCGCC	270	279
<i>arp-iclR</i>	fw -GCTCAATCTCATAATGCAGCC rv -CACGTATTACCGATGACCG	315	333/324

Tabla 2. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar las secuencias *target* del LSPA-6.

<i>Target</i>	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo elongación final (min)
<i>fold-sfmA</i> <i>yhG</i> <i>rtcB</i> <i>rbsB</i> <i>arp-iclR</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C / 00:30 Annealing 52,2°C / 00:30 Elong. 72°C / 00:45	30	72°C/10:00
<i>Z5835</i>	94°C/04:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 50°C a 40°C/00:45 (-1°C/ciclo) Elong. 72°C/01:00	11	72°C/05:00
		Desnat. 94°C/00:30 Annealing 52°C/00:45 Elong. 72°C/01:00	20	

Tabla 3. Perfiles genéticos y linajes LSPA-6 de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.

No. de aislamiento	Perfil genético LSPA-6						Linaje
	<i>fold-sfmA</i>	<i>Z5935</i>	<i>yhcG</i>	<i>rtcB</i>	<i>rbsB</i>	<i>arp-iclR</i>	
1	2	1	1	1	1	1	I/II
2	2	1	1	1	1	1	I/II
3	2	1	1	1	1	1	I/II
4	2	1	1	1	1	1	I/II
5	2	1	1	1	1	1	I/II
6	2	1	1	1	1	1	I/II
7	2	1	1	1	1	1	I/II
8	2	1	1	1	1	1	I/II
9	2	1	1	1	1	1	I/II
10	2	1	1	1	1	1	I/II
11	2	1	1	1	1	1	I/II
12	2	1	1	1	1	1	I/II
13	2	1	1	1	1	1	I/II
14	2	1	1	1	1	1	I/II
15	2	1	1	1	1	1	I/II
16	2	1	1	1	1	1	I/II
17	2	1	1	1	1	1	I/II
18	2	1	1	1	1	1	I/II
19	2	1	1	1	1	1	I/II
20	2	1	1	1	1	1	I/II
21	2	1	1	1	1	1	I/II
22	2	1	1	1	1	1	I/II
23	2	1	1	1	1	1	I/II
24	2	1	1	1	1	1	I/II
25	2	1	1	1	1	1	I/II
26	2	1	1	1	1	1	I/II
27	2	1	1	1	1	1	I/II
28	2	2	1	2	1	2	II
29	2	1	1	1	1	1	I/II
30	2	1	1	1	1	1	I/II
31	2	1	1	1	1	1	I/II
32	2	1	1	1	1	1	I/II
33	2	1	1	1	1	1	I/II
34	2	1	1	1	1	1	I/II
35	2	1	1	1	1	1	I/II
36	2	1	1	1	1	1	I/II
37	2	1	1	1	1	1	I/II
38	2	1	1	1	1	1	I/II
39	2	1	1	1	1	1	I/II
40	2	1	1	1	1	1	I/II
41	2	1	1	1	1	1	I/II
42	2	1	1	1	1	1	I/II
43	2	1	1	1	1	1	I/II

2.4.2 Análisis de polimorfismos de nucleótido simple (SNP)

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) han sido usados para determinar relaciones genéticas entre cepas O157:H7, las cuales pueden o no estar epidemiológicamente relacionadas (Manning *et al.*, 2008). El término *Single nucleotide polymorphisms* (SNP) se utiliza para denotar cambios nucleotídicos puntuales, en contraste con las inserciones, deleciones y pequeñas inversiones (Weissman *et al.*, 2003). Estas mutaciones son abundantes y se encuentran ampliamente distribuidas en el genoma de muchas especies, tanto en regiones codificantes como en las no codificantes (Morin *et al.*, 2004). En bacterias patógenas, han sido descritos diferentes SNP. Algunas de estas mutaciones, principalmente las que ocurren en regiones codificantes, promueven la patogenicidad, es decir que son “patoadaptativas”. Estas alteraciones en genes estructurales o reguladores proveen ventajas adaptativas durante el curso de una infección, durante el desarrollo de una epidemia o bien permiten la evolución de la virulencia a largo plazo (Sokurenko *et al.*, 1999; Weissman *et al.*, 2003).

La genotipificación por SNP ha permitido establecer relaciones evolutivas dentro VTEC O157:H7 (Bono *et al.*, 2012) y distinguir subtipos, incluyendo aquellos asociados al reservorio bovino y/o con una incrementada virulencia en humanos (Manning *et al.*, 2008; Clawson *et al.*, 2009).

a) Identificación de aislamientos característicos del clado 8

Introducción:

Manning y colaboradores (2008) postularon que el aumento de la morbilidad en los brotes por VTEC O157:H7 asociados al consumo de productos frescos, se encontraba relacionado al aumento en la virulencia de este patógeno. Para probar esta hipótesis, desarrollaron un esquema de subtipificación basado en 96 *loci* SNP y genotiparon más de 500 aislamientos clínicos VTEC O157:H7. Los aislamientos pudieron agruparse en 9 clados evolutivos, observándose diferencias entre ellos, en cuanto a la frecuencia y distribución de los genes que codifican las Vtx y al tipo de enfermedad clínica reportada. Los pacientes con SUH fueron asociados significativamente a cepas agrupadas en el clado 8, las cuales han aumentado en frecuencia en los últimos años (Manning *et al.*, 2008). En nuestro país, Pianciola y colaboradores (2016) describieron la circulación con una alta prevalencia de cepas pertenecientes en su mayoría al clado 8, responsables de enfermedad más severa, de progresión rápida y altos porcentajes de hospitalización.

Por su parte, Liu y colaboradores (2009) identificaron 7 genes *rhs* con variaciones en su secuencia de ADN que podrían servir potencialmente como marcadores para la subtipificación de *E. coli* O157:H7. Particularmente, Franz y colaboradores (2012) desarrollaron un ensayo de PCR complementado con análisis de polimorfismos de longitud para fragmentos de restricción o RFLP dirigido a uno de los SNP, ubicado en la posición 3468 del gen *rhsA* (*rhsA* 3468 C>G), el cual permite identificar aislamientos pertenecientes al clado 8.

Materiales y métodos:

La identificación de aislamientos pertenecientes al clado 8 se realizó mediante la detección de un SNP ubicado en una porción del gen *rhsA* (SNP en posición 3468) por la técnica de PCR- RFLP.

Para ello se amplificó por PCR un fragmento del gen *rhsA* con los *primers* descritos por Franz *et al.* (2012) (Tabla 4). El cóctel de reacción de PCR incluyó solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 pmol de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de termociclado que se implementaron en la PCR se obtuvieron a partir de la puesta a punto correspondiente para la detección del *target* y se detallan en la Tabla 5.

El amplímero obtenido se analizó por RFLP mediante cortes con las enzimas de restricción Sau961 y HaeII (New England BioLabs, UK), de acuerdo a condiciones descritas por Franz *et al.* (2012). Los amplímeros de aislamientos pertenecientes al clado 8 [*rhsA* (3468C)], generan 2 fragmentos de restricción con la enzima HaeII de 525 y 110 pb, mientras que con Sau961 resultan en 3 fragmentos de 296, 273 y 66 pb respectivamente. Los aislamientos que no pertenecen al clado 8 [*rhsA* (3468G)] dan como resultado 3 fragmentos de restricción con la enzima HaeII, de 269, 256 y 110 pb, y 2 fragmentos con Sau96I, de 339 y 296 pb (Tabla 6). Las condiciones de digestión del amplímero fueron modificadas de las de Franz *et al.* (2012) (Tabla 6). Las cepas de referencia utilizadas como controles positivos de clado 8 fueron Anguil 9.1 y VAC 07-2 y de no clado 8, EDL 933.

Los productos de PCR-RFLP fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 %, teñidos con bromuro de etidio. Se sembraron 10 µl de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x y la corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 40 minutos en *buffer* TBE 1x. La visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway).

Resultados:

Los 43 aislamientos VTEC O157:H7 estudiados presentaron el patrón de bandas PCR-RFLP asociado al clado 8.

Tabla 4. Secuencias de los *primers* empleados y tamaño del producto amplificado para la identificación de cepas pertenecientes al clado 8. Adaptado de Franz y colaboradores, 2012.

<i>Target</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	Tamaño del amplímero (pb)
<i>rhsA</i>	fw -CCACAATACAGAACGACAGA rv -ACCTTGCGGATCTACATTTA	635

Tabla 5. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar *rhsA*.

<i>Target</i>	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo elongación final (min)
<i>rhsA</i>	95°C/05:00	Desnat. 94°C/01:00 Annealing 58°C/01:00 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/10:00

Tabla 6. Condiciones de digestión con enzimas de restricción y fragmentos generados.

Enzima	Cóctel	Digestión Temp/Tiempo (horas)	Tamaño de los fragmentos (pb)	
			Clado 8	No clado 8
HaeII	- 10 µl ADN - 34 µl H2O - 5 µl <i>buffer</i> - 20 U HaeII	37°C/02:00	- 525 - 110	- 269 - 256 - 110
Sau961	- 10 µl ADN - 34 µl H2O - 5 µl <i>buffer</i> - 10U HaeII		- 296 - 273 - 66	- 339 - 296

b) Subtipificación mediante polimorfismos A/T en el gen *tir*

Introducción:

Bono y colaboradores (2007) identificaron un polimorfismo en el gen *tir* que permite distinguir subtipos de VTEC O157:H7 asociados al reservorio bovino de aquellos asociados a una incrementada virulencia en humanos. Los autores describieron un SNP en la posición 255 del gen *tir* (*tir* 255 T>A). Como se mencionó anteriormente, este gen está localizado en el *locus* LEE y codifica para el receptor de la intimina, siendo este complejo responsable de la adherencia íntima de *E. coli* O157:H7 a las células del epitelio intestinal (McDaniel *et al.*, 1995). Los autores citados encontraron mayor prevalencia del alelo T de este SNP en cepas asociadas con enfermedad en el hombre en relación al alelo A, observado en cepas de origen no humano. Este polimorfismo está localizado en la secuencia del gen que codifica para una región cercana al extremo amino del receptor Tir, porción de la molécula que normalmente se encuentra en el citosol del huésped durante la unión Tir-Intimina en la adherencia bacteria-célula huésped (Luo *et al.*, 2000), para esta región, hasta el momento, no se ha descrito función alguna.

El alelo *tir* 255 T>A T es identificado con mayor frecuencia en aislamientos de muestras de humanos, mientras que el alelo *tir* 255 T>A A se encuentra altamente asociado con aislamientos de bovinos (Bono *et al.*, 2007).

Con el objetivo de detectar subpoblaciones relacionadas con el origen de las cepas, se analizó por secuenciación el polimorfismo A/T en la posición 255 del gen *tir* en cepas nativas.

Materiales y métodos:

La identificación del SNP se realizó amplificando una secuencia de 169 pb del gen *tir* mediante una PCR simple, utilizando los *primers* que se detallan en la Tabla 7.

El cóctel para la reacción de PCR incluyó solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 pmol de cada *primer*, 1 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 1 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Las condiciones de termociclado que se implementaron se obtuvieron a partir de la puesta a punto correspondiente y se detallan en la Tabla 8.

Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio, con el objetivo de corroborar la eficiencia de la reacción. Se sembraron 8 µl de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 20

minutos en *buffer* TBE 1x. La visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway).

Los amplímeros fueron secuenciados en un analizador 3500 GENETIC ANALYZER en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT), Universidad de Jaén, España. Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software Chromas 2.32 (Technelysium Pty. Ltd.), y se alinearon con el software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) frente a cepas de referencia.

Resultados:

Mediante esta técnica fue posible subtipificar 36 aislamientos de los 43 involucrados en este estudio. En el 92 % de los aislamientos analizados se detectó el alelo *tir* 255 T>A **T**, mayormente asociado a cepas con una incrementada virulencia en humanos (Tabla 9). Este alelo se encontró tanto en aislamientos de origen humano (90 %) como en aislamientos bovinos (93 %). En el 8 % de los aislamientos restantes se detectó el alelo *tir* 255 T>A **A**, en una cepa aislada de bovino (Nº 15) y en dos aisladas de humanos (Nº 40 y 41) (Tabla 9).

Tabla 7. Secuencias de los *primers* empleados y tamaño del producto amplificado para la identificación del SNP en la posición 255 del gen *tir* (*tir* 255 T>A). Adaptado de Bono y colaboradores, 2009.

<i>Target</i>	<i>Primers</i> (5'-3')	Tamaño del amplímero (pb)
<i>tir</i>	fw- GAGTATCGAGCGGACCATGATC	169
	rv- TGGCGGCGTCTGAGATAAC	

Tabla 8. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar *tir*.

<i>Target</i>	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo elongación final (min)
<i>tir</i>	94°C/02:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 60°C/00:30 Elong. 72°C/00:10	35	72°C/05:00

Tabla 9. Alelos *tir* 255 T>A en los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.

No. de aislamiento	Origen	Alelo
1	Alimento	T
2		T
3		T
4		T
5		T
6		T
7		T
9		T
10	Bovino	T
12		T
13		T
14		T
15		A
16		T
17		T
20		T
21		T
22		T
23		T
24		T
25		T
26		T
27		T
29		T
30		T
31	Humano	T
32		T
34		T
36		T
37		T
38		T
39		T
40		A
41		A
42		T
43		T

2.4.4 Análisis de múltiples loci VNTR (MLVA)

Introducción:

El análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA, *Multiple Loci VNTR Analysis*) es una herramienta confiable, que permite establecer relaciones genéticas entre cepas bacterianas para la vigilancia epidemiológica y la subtipificación molecular de organismos patógenos como VTEC (Lindstedt *et al.*, 2003; 2004; 2007; Noller *et al.*, 2003; 2004; 2006; Keys *et al.*, 2005). Esta técnica permite diferenciar aislamientos estrechamente relacionados y a nivel epidemiológico, la asociación entre aislamientos obtenidos de pacientes, con aislamientos provenientes de alimentos contaminados y reservorios, como también la interpretación de presuntos brotes (Keim *et al.*, 2000; Noller *et al.*, 2003; Lindstedt, 2005).

Las repeticiones en tandem de número variable (VNTR- *Variable Number Tandem Repeats*) son regiones de alta variabilidad, dispersas en los genomas eucariotas y procariotas. Consisten en secuencias cortas (conocidas como unidades de repetición o motivos) que se repiten en tandem y varían en el número de copias, creando polimorfismos de longitud (Lindstedt, 2005). Poseen una tasa de mutación mayor en relación a otras regiones del genoma, lo que los hace útiles para identificar diversidad genética en una corta escala temporal o a corto plazo (Vogler *et al.* 2006, Bustamante *et al.* 2013). Los VNTR pueden ser detectados fácilmente por PCR usando *primers* complementarios a las secuencias flanqueantes de los mismos (Keim *et al.*, 2000).

En relación a la subtipificación molecular del serotipo O157:H7 mediante MLVA, se han desarrollado protocolos específicos para el mismo (Keys *et al.*, 2005; Noller *et al.*, 2003; Lindstedt *et al.*, 2003; 2004; 2007), así como otros que permiten, además, la subtipificación de serotipos no-O157:H7 (Lindstedt *et al.*, 2007; Izumiya *et al.*, 2010; Miko *et al.*, 2010). En el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, FCV-UNCPBA, se ha puesto a punto e implementado desde hace ya varios años un ensayo de MLVA específico para VTEC O157:H7. Esta metodología fue modificada permitiendo prescindir del uso de secuenciadores automáticos y de esta manera puede ser utilizada en laboratorios que no cuentan con dicha tecnología (Bustamante *et al.*, 2009).

Materiales y métodos:

Se analizaron ocho *loci* VNTR, previamente descriptos en la literatura, Vhec2, Vhec4 y Vhec7 (Lindstedt *et al.*, 2003), TR3, TR4 y TR7 (Noller *et al.*, 2003), O157-3 y O157-37 (Keys

et al., 2005). En la Tabla 10 se detallan las secuencias de los *primers* utilizados. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las descritas por Bustamante *et al.* (2009) y se detallan en la Tabla 11.

Los cócteles para las reacciones simples incluyeron solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 pmol de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6 % con *buffer* TBE 1x. Para la preparación de los geles se utilizaron 15 ml de acrilamida/bisacrilamida desnaturizante al 6 %, y para su polimerización se agregaron 25 µl de persulfato de amonio 40 % y 15 µl de tetrametilen-diamina (TEMED) (Anexo III). Al volumen de muestra inicial (25 µl), se le agregó 12,5 µl de loading *buffer* desnaturizante y de ello se sembraron 6 µl. La corrida electroforética se realizó a una potencia constante de 20 watts y con voltaje y miliamperaje variables. El tiempo de corrida varió de acuerdo al tamaño del amplímero analizado, siendo en promedio una hora.

Las muestras se visualizaron por tinción con sales de plata, según el protocolo propuesto por Promega (Gene Print STR Systems, Silver Strain Detection, Promega, Madison, USA), utilizando como referencia alelos secuenciados en estudios anteriores. Los alelos fueron nombrados de acuerdo al número de repeticiones en tandem o unidades de repetición (UR). La ausencia de producto de amplificación se consideró como alelo nulo y se le asignó un número arbitrario (-2). Las variantes alélicas nuevas halladas fueron secuenciadas en un analizador ABI PRISM 3730XL (Macrogen, Inc, Corea). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software Chromas 2.32 (Technelysium Pty. Ltd.), y se alinearon con el software Clustal W (Larkin *et al.*, 2007) frente a cepas de referencia. Las repeticiones parciales se aproximaron hasta el número de repetición completo más cercano (Hyytiä-Trees *et al.*, 2006).

Para la caracterización y el análisis de la diversidad genética se calcularon las frecuencias alélicas, número y frecuencias de perfiles MLVA y el índice de diversidad genética de *Nei* (D_N). Este último se calculó para cada *locus* VNTR utilizando la siguiente fórmula: $D_N: 1 - \sum (fra)^2$, donde *fra* corresponde a la frecuencia alélica (Noller *et al.*, 2003). En este cálculo fueron incluidos los alelos nulos. Además, para evaluar el poder de discriminación del método de tipificación se utilizó el índice de diversidad de Simpson (D_S):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

donde N es el número total de aislamientos, S es el número total de perfiles descriptos y n_j es el número de aislamientos que pertenece a cada perfil (Hunter y Gaston, 1988).

En base a los perfiles genéticos obtenidos para cada aislamiento se construyó un dendograma utilizando el software BioNumerics vs. 6.6 (*Applied-Maths*). El agrupamiento se realizó por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages*) para datos categóricos, utilizando el coeficiente de similitud.

Resultados:

Los 43 aislamientos VTEC O157:H7 fueron tipificados exitosamente por este ensayo de MLVA que incluyó 8 VNTR (Tabla 12).

El número de alelos detectado por *locus* varió entre 4 (O157-37) y 10 (Vhec4). Este último VNTR (Vhec4) fue el más polimórfico. Cuatro VNTR presentaron alelos nulos (Vhec4, Vhec7, TR3, O157-3). En la Tabla 13 se muestra el número de alelos detectados para cada VNTR.

El número de repeticiones (UR) identificado varió entre 1 y 17 UR.

Los índices de diversidad genética de *Nei* (D_N) fueron calculados para cada VNTR (Tabla 13). El índice más bajo lo presentó el marcador TR4 (D_N : 0,56), mientras que O157-3 mostró el valor más alto (D_N : 0,85), seguido por Vhec4 y Vhec7 (D_N : 0,79).

El índice de diversidad de *Simpson* fue D_S : 0,98. Este último valor indica que si 2 aislamientos no relacionados son tomados al azar, existen 98 % de posibilidades de que los mismos presenten diferentes perfiles de MLVA.

En la Figura 4 se muestra la distribución de perfiles MLVA sin discriminar perfiles únicos. El agrupamiento obtenido en base a los resultados de MLVA, muestra una alta diversidad genética entre los aislamientos O157:H7 circulantes en la región pampeana de Argentina (Figura 5).

Se observaron 36 perfiles MLVA diferentes, 33 de los cuales fueron únicos. El perfil más frecuente fue 9-11-6-2-5-9-7-6, registrado en 6 aislamientos bovinos de pastoreo (N° 7, 8, 9, 10, 11 y 12). Otros perfiles MLVA no únicos fueron compartidos por los aislamientos N° 2 y 4 obtenidos de 2 bovinos de *feedlot* y, por los aislamientos N° 36 (paciente asintomático familiar de caso clínico) y 38 (obtenido de un caso clínico).

Tabla 10. Secuencias de los *primers* empleados y tamaño aproximado del producto amplificado para cada VNTR en el MLVA.

VNTR	Primers (5'-3')	Tamaño amplímero (pb)	Referencia
Vhec2	fw-AACCGTTATGAAAGAAAGTCCT rv-TCGCCCAGTAAGTATGAAATC	469	Lindstedt <i>et al.</i> , 2003
Vhec4	Fw-ATCGCCTTCTTCTCCGTAATG rv-CTCCTCGCGCTCAGACAGTG	534	
Vhec7	Fw-ATGCGCGGTTAGCTACACGACA rv-TGAAAGCCACACCATGCGATAAT	288	
TR2	fw-CGCAGTTGATACCTACGG rv-GGAAGGAAGCTGATAGGT	209/515	Noller <i>et al.</i> , 2003
TR3	fw-TCTTGTC AATATAGATTGG rv-TGATTAAGCGTGTACTGA	85/128	
TR4	fw-GGTGATGGCTTGATATTGA rv-GCCACACTGCGAGTATAGAG	147/183	
TR7	fw-CGCAGTGATCATTATTAGC rv-TGCTGAAACTGACGACCAGT	186/216	Keys <i>et al.</i> , 2005
O157-3	fw-GGCGGTAAGGACAACGGGGTGTTTGAATTG rv-GAACAACCTAAAACCCGCCTCGCCATCG	377	
O157-37	fw-GCCGCCCCTTACATTACGCGGACATTC rv-GCAGGAGAACAAACAAACAGACAGTAATCAGAGCAGC	184	

Tabla 11. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar los VNTR.

VNTR	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo elongación final (min)
Vhec2, Vhec4 y Vhec7	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 50°C/01:00 Elong. 72°C/00:50	30	72°C/10:00
TR2	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 53°C/01:00 Elong. 72°C/00:50	30	72°C/10:00
TR3, TR4 y TR7	94°C/04:00	Desnat. 94°C/00:45 Annealing 56°C/00:45 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/05:00

Tabla 12. Distribución de alelos para cada *locus* VNTR y para cada aislamiento VTEC O157:H7.

No. de aislamiento	V2	V4	V7	TR3	TR4	TR7	O157-3	O157-37
1	9	8	-2	-2	5	8	4	7
2	8	11	8	2	5	7	12	6
3	8	9	6	2	6	9	6	6
4	8	11	8	2	5	7	12	6
5	8	9	6	2	6	10	6	6
6	10	8	-2	1	4	9	7	7
7	9	11	6	2	5	9	7	6
8	9	11	6	2	5	9	7	6
9	9	11	6	2	5	9	7	6
10	9	11	6	2	5	9	7	6
11	9	11	6	2	5	9	7	6
12	9	11	6	2	5	9	7	6
13	9	10	-2	1	5	8	4	9
14	8	13	5	4	4	8	9	7
15	10	17	-2	1	4	8	9	7
16	10	16	-2	2	4	8	8	7
17	7	7	11	4	5	7	11	7
18	9	10	-2	1	5	7	4	9
19	10	16	-2	2	4	8	8	6
20	9	13	7	2	5	8	7	6
21	9	7	11	2	5	6	12	5
22	9	11	8	2	5	9	6	7
23	9	15	8	2	4	8	6	6
24	8	8	-2	1	5	8	-2	6
25	10	8	-2	1	1	8	4	7
26	9	11	8	1	5	9	-2	6
27	10	11	11	2	5	8	13	7
28	10	11	6	2	3	6	8	6
29	9	15	8	2	6	12	-2	9
30	5	-2	7	3	3	7	3	6
31	9	8	12	8	5	6	-2	9
32	9	11	8	2	5	9	7	6
33	10	11	-2	1	3	8	7	6
34	9	11	8	2	5	10	7	6
35	8	3	9	2	3	8	12	5
36	9	11	-2	1	5	8	4	7
37	7	13	6	2	5	8	7	7
38	9	11	-2	1	5	8	4	7
39	8	10	11	4	5	7	4	6
40	6	-2	12	3	3	8	3	9
41	9	15	-2	1	4	8	8	7

No. de aislamiento	V2	V4	V7	TR3	TR4	TR7	O157-3	O157-37
42	8	7	5	4	5	9	13	6
43	8	13	6	4	5	8	13	6

El nombre de los alelos se corresponde con el número de UR; aquellos codificados con -2 presentaron alelo nulo.

Tabla 13. Caracterización de los *loci* VNTR estudiados.

	Vhec2	Vhec4	Vhec7	TR3	TR4	TR7	O157-3	O157-37
Tamaño UR (pb)	18	6	7	6	6	6	6	6
Nº alelos	6	10	7	5	5	6	9	4
Rango alélico (UR)	5-10	3-17	5-12	1-8	3-6	6-12	3-13	5-9
Alelos nulos	no	si	si	si	no	no	si	no
Índice de Nei (D_N)	0,67	0,79	0,79	0,63	0,56	0,68	0,85	0,61

UR: Unidad de repetición

Figura 4. Distribución de perfiles genéticos obtenidos por MLVA, sin discriminar los perfiles únicos.

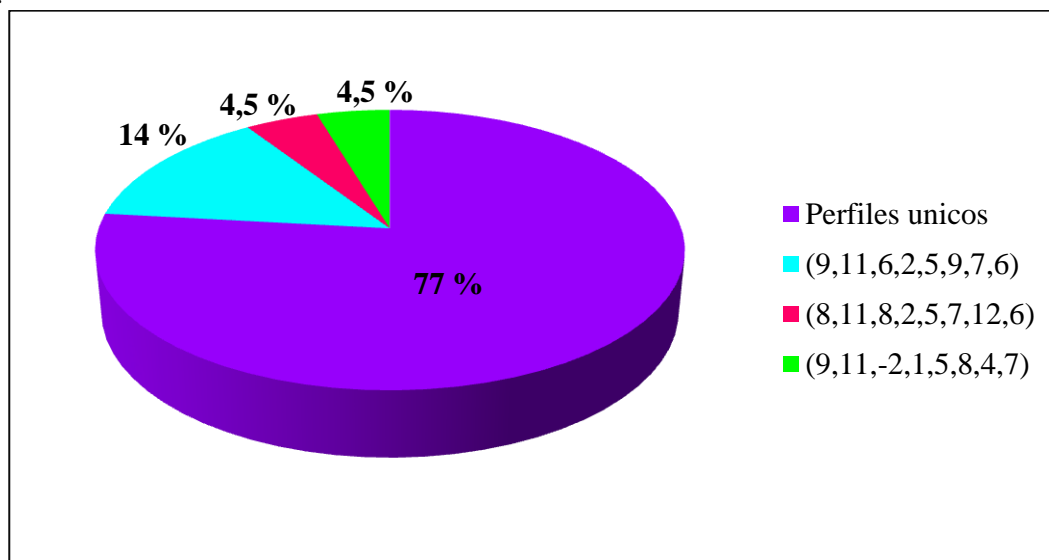
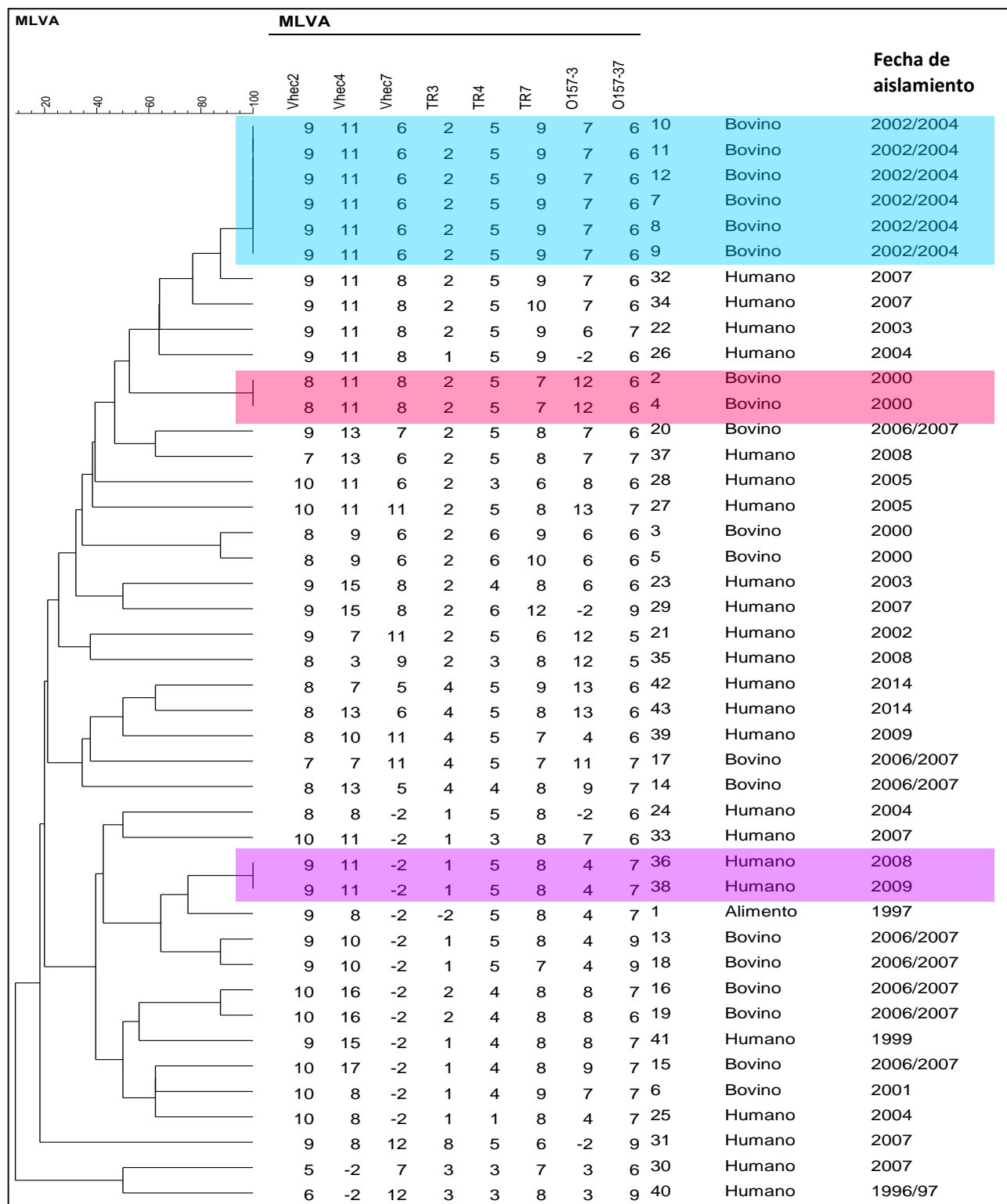


Figura 5. Dendrograma de aislamientos VTEC O157:H7, construido por UPGMA, en base a sus perfiles MLVA. Se encuentran resaltados los perfiles MLVA compartidos.



2.4.5 Determinación de grupos filogenéticos

Introducción:

La población de *E. coli* posee una subestructura genética predominantemente clonal, pudiéndose delimitar diferentes grupos filogenéticos (Tenaillon *et al.*, 2010). Estos filogrupos difieren en sus características feno-genotípicas, sus nichos ecológicos y su capacidad de enfermar (Clermont *et al.*, 2000). Se han observado cepas que difieren en la utilización de diferentes azúcares, en sus perfiles de resistencia a antibióticos, en los rangos de temperatura óptimas para su crecimiento, y en la presencia y/o ausencia de factores de virulencia (Gordon *et al.*, 2008; Carlos *et al.*, 2010).

Diversos estudios sobre el origen evolutivo de *E. coli* patógeno han demostrado que las cepas de *E. coli* pueden clasificarse filogenéticamente en 4 grupos principales: A, B1, B2 y D.

Clermont y colaboradores (2000), en base a tres marcadores, desarrollaron una PCR que permite detectar fragmentos de los mismos: gen *chuA*, que codifica un transportador del grupo HEM en *E. coli* enterohemorrágico O157:H7; *yjaA*, involucrado en la respuesta celular al peróxido de hidrógeno y al estrés ácido (Lee *et al.*, 2010) y un fragmento de ADN (TspE4.C2) que posteriormente fue caracterizado como un gen putativo de una lipasa. La presencia/ausencia de estos tres fragmentos, permite asignar filogrupos a distintas cepas de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2013).

La comparación de los datos de filogrupo con datos de tipificación de secuencias de múltiples *loci* (MLST) de cepas de referencia de *E. coli* aisladas de diferentes hábitats y fuentes, permitieron validar los filogrupos asignados (Gordon *et al.*, 2008). Sin embargo, también se observó la existencia de algunas cepas con genotipo incierto que no pudieron asignarse correctamente a ninguno de los filogrupos descritos ni a los datos de MLST. Posteriormente fue posible identificar nuevos subgrupos, ampliándose a 7 el panel previamente descrito por Clermont y colaboradores (2000). Los 7 filogrupos (A, B1, B2, C, D, E y F) corresponden a *E. coli sensu stricto*, mientras que habría un octavo que correspondería al clado I críptico de *Escherichia*. Esto permite incrementar el poder de discriminación al analizar la población de *E. coli* (Clermont *et al.*, 2013). Esta clasificación extendida, proporciona una mayor comprensión sobre el hospedador y los factores ambientales que dan forma a la estructura genética de *E. coli* en sus hábitats naturales.

Materiales y métodos:

Los grupos filogenéticos fueron determinados utilizando un protocolo de PCR-*cuadruplex* propuesto por Clermont *et al.* (2013), que permite identificar 7 grupos pertenecientes a *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E y F) y uno correspondiente a *Escherichia* Clado I. Los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación se detallan en las Tablas 14 y 15.

El cóctel para la reacción tetravalente incluyó solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmol de *primers* para amplificar *chuA*, *yjaA* y TspE4.C2, 40 pmol de *primers* para *arpa*, 1 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Los cócteles para las reacciones simples de los Grupos E y C incluyeron solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 20 pmol de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Las reacciones de PCR se efectuaron en dos cicladores térmicos programables: *T-17 Ivema* y *Multigene Optimax*. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio. Se sembraron 8 µl de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 30 minutos en *buffer* TBE 1x. La visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway).

La asignación a los distintos grupos filogenéticos se realizó a acuerdo a los patrones de bandas observados en los geles, según la información contenida en la Tabla 16.

Resultados:

Mediante la PCR propuesta fue posible asignar filogrupo a 42 de los 43 aislamientos VTEC O157:H7. La mayoría de los aislamientos (95,4 %) perteneció al grupo filogenético E, sin embargo, se detectó un aislamiento perteneciente al grupo filogenético A (N° 27) y otro no pudo ser asociado a ningún grupo (N° 35) (Tabla 17).

Tabla 14. Secuencias de los *primers* empleados y tamaño de los productos amplificados para la determinación de grupos filogenéticos.

Reacción de PCR	Target	Primers (5'-3')	Tamaño del amplímero (pb)	Referencia
Cuádruple	<i>arpa</i>	fw-AACGCTATTCGCCAGCTTGC rv-TCTCCCCATACCGTACGCTA	400	Clermont <i>et al.</i> , 2013
	<i>chuA</i>	fw-ATGGTACCGGACGAACCAAC rv-TGCCGCCAGTACCAAAGACA	288	Clermont <i>et al.</i> , 2013 Clermont <i>et al.</i> , 2000
	<i>yjaA</i>	fw-CAAACGTGAAGTGTCAGGAG rv-AATGCGTTCCTCAACCTGTG	211	Clermont <i>et al.</i> , 2013
	TspE4.C2	fw-CACTATTCGTAAGGTCATCC rv-AGTTTATCGCTGCGGGTCGC	152	
Grupo E	<i>arpa</i>	fw-GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC rv-GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG	301	Lescat <i>et al.</i> , 2013
Grupo C	<i>trpA</i>	fw-AGTTTTATGCCAGTGCGAG rv-TCTGCGCCGGTCACGCCC	219	

Tabla 15. Condiciones de termociclado utilizadas para la determinación de grupos filogenéticos.

Reacción de PCR	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo elongación final (min)
Cuádruple	94°C/04:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 59°C/00:30 Elong. 72°C/00:30	30	72°C/05:00
Grupo E	94°C/04:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 57°C/00:30 Elong. 72°C/00:30	30	72°C/05:00
Grupo C	94°C/04:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 62°C/00:30 Elong. 72°C/00:30	30	72°C/05:00

Tabla 16. Genotipos cuádruples y asignación a grupos filogenéticos de *E. coli*. Adaptado de Clermont y colaboradores (2013).

Genotipo cuádruple				Filogrupo
<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspE4.C2	
+	-	-	-	A
+	-	-	+	B1
-	+	-	-	F
-	+	+	-	B2
-	+	+	+	B2
-	+	-	+	B2
+	-	+	-	A o C ¹
+	+	-	-	D o E ²
+	+	-	+	D o E ²
-	-	-	+	Desconocido ³
-	-	+	+	Desconocido ³
+	-	+	+	Desconocido ³
+	+	+	+	Desconocido ³
-	-	-	-	Desconocido ³

¹ Realizar PCR Grupo C. Si resulta C+, pertenece al filogrupo C, sino al A.

² Realizar PCR Grupo E. Si resulta E+, pertenece al filogrupo E, sino al D.

³ Realizar Tipificación de secuencias de múltiples *locus* (*Multilocus sequence typing*- MLST).

Tabla 17. Perfiles obtenidos y grupos filogenéticos asignados de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.

No. de aislamiento	Genotipo				Filogruppo	PCR Grupo E
	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4c2</i>		
1	+	+	-	+	D/E	E
2	+	+	-	+	D/E	E
3	+	+	-	+	D/E	E
4	+	+	-	-	D/E	E
5	+	+	-	-	D/E	E
6	+	+	-	-	D/E	E
7	+	+	-	+	D/E	E
8	+	+	-	-	D/E	E
9	+	+	-	+	D/E	E
10	+	+	-	+	D/E	E
11	+	+	-	+	D/E	E
12	+	+	-	+	D/E	E
13	+	+	-	-	D/E	E
14	+	+	-	-	D/E	E
15	+	+	-	+	D/E	E
16	+	+	-	-	D/E	E
17	+	+	-	-	D/E	E
18	+	+	-	-	D/E	E
19	+	+	-	-	D/E	E
20	+	+	-	+	D/E	E
21	+	+	-	-	D/E	E
22	+	+	-	+	D/E	E
23	+	+	-	-	D/E	E
24	+	+	-	-	D/E	E
25	+	+	-	+	D/E	E
26	+	+	-	-	D/E	E
27	+	-	-	-	A	-
28	+	+	-	+	D/E	E
29	+	+	-	-	D/E	E
30	+	+	-	+	D/E	E
31	+	+	-	+	D/E	E
32	+	+	-	-	D/E	E
33	+	+	-	+	D/E	E
34	+	+	-	+	D/E	E
35	+	+	+	+	Desconocido	-
36	+	+	-	-	D/E	E
37	+	+	-	-	D/E	E
38	+	+	-	-	D/E	E
39	+	+	-	-	D/E	E
40	+	+	-	-	D/E	E

No. de aislamiento	Genotipo				Filogrupo	PCR Grupo E
	<i>arpA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE4c2</i>		
41	+	+	-	-	D/E	E
42	+	+	-	-	D/E	E
43	+	+	-	-	D/E	E

SECCIÓN EXPERIMENTAL II:

Análisis de genes relacionados con virulencia en aislamientos nativos VTEC O157:H7

2.5 Objetivo: Analizar la distribución de genes codificantes de factores putativos de virulencia (FPV), de genes plasmídicos que codifican factores de virulencia, de genes ubicados en islas de patogenicidad (OI-36, OI-57, OI-71 y OI-122) que codifican efectores del sistema de secreción tipo III y de genes que codifican factores de adherencia en aislamientos VTEC O157:H7.

2.5.1 Detección de genes codificantes de factores putativos de virulencia (FPV)

Introducción:

Kulasekara y colaboradores (2009) compararon el genoma de TW14359, una cepa O157:H7 asociada a un brote de SUH en EE.UU. por el consumo de espinacas contaminadas, con los de otras dos cepas aisladas de brotes, previamente secuenciadas (EDL 933 y Sakai). El análisis comparativo permitió identificar 7 secuencias que podrían ser responsables de la alta virulencia de TW14359. Dichas secuencias son: ECSP_0242 (codifica un factor de virulencia que facilita la interacción proteína-proteína), ECSP_1773 (codifica una proteína que interfiere en la respuesta inmune, previniendo la activación de los efectores NF- κ B), ECSP_2687 (codifica una proteína que reduce la expresión de citoquinas), ECSP_2870/2872 (promovería la adaptación de *E. coli* a células hospedadoras vegetales), ECSP_3286 (codifica una proteína de membrana externa que facilita el transporte extracelular del complejo hemo) y ECSP_3620 (codifica una óxido nítrico- reductasa, Norv).

Materiales y métodos:

Se amplificaron por PCR los genes FPV descritos por Kulasekara y colaboradores (2009): ECSP_0242, ECSP_1773, ECSP_2870/2872, ECSP_2687, ECSP_3286 y ECSP_3620. Los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación se detallan en las Tablas 18 y 19.

Todos los genes se amplificaron en reacciones de PCR simples. Los cócteles para la amplificación de ECSP_0242, ECSP_1773, ECSP_2687, ECSP_3286 y ECSP_3620 incluyeron una solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2 pmoles de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 μ l de extracto de ADN, en un volumen final de 25 μ l.

El cóctel para la amplificación de ECSP_2870/2872 se realizó en una solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2 pmoles de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 4 μ l de extracto de ADN, en un volumen final de 25 μ l.

Las reacciones de PCR se efectuaron en dos cicladores térmicos programables: *T-17 Ivema* y *Multigene Optimax*. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio. Se sembraron 8 μ l de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 20 minutos en *buffer* TBE 1x. La

visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway).

En base a los perfiles genéticos obtenidos para cada aislamiento se construyó una red de tipo *Minimum Spanning Tree* (MST), utilizando el software BioNumerics vs. 6.6 (*Applied-Maths*).

Resultados:

Todos los aislamientos presentaron el gen ECSP_0242; el 95 % de las cepas tuvo ECSP_2687, el 88 %, ECSP_3286, el 86 %, ECSP_3620, el 53 %, ECSP_2870/2872 y el 44 %, ECSP_1733. ECSP_1773 y ECSP_2870/2872 fueron más prevalentes entre los aislamientos de origen bovino (63 % y 84 % respectivamente vs 30 % y 26 %, los mismos genes en aislamientos de origen humano) (Tabla 20, Figura 6).

En relación a los genes que codifican FPV, los aislamientos se agruparon en 10 perfiles (Figura 7). El perfil más prevalente (28 %) mostró ausencia del ECSP_1773. El segundo perfil más prevalente (23 %) resultó positivo para todos los genes. Estos dos perfiles fueron mayormente compartidos por aislamientos de origen bovino (en un 60 % y 90 % respectivamente). Los aislamientos de origen humano presentaron mayor diversidad de perfiles que los aislamientos de bovinos (10 vs 4, respectivamente).

Tabla 18. Secuencias de los *primers* empleados para la identificación de genes codificantes de factores putativos de virulencia, y tamaño de los productos amplificados. Adaptado de Kulasekara y colaboradores, 2009.

<i>Target</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	Tamaño del amplímero (pb)
ECSP_0242	fw -CCGATTTATGGAGGAAGCCAATG rv -GCATTACACCCAGGCTTATTCAG	749
ECSP_1773	fw -TCTTTAAATTTTCATAACAAGGGCA rv -TGTACGCATCTGTAATCGTCG	590
ECSP_2687	fw - AAGAACCCTACTACCTATTAGCGCC rv -GGGTTGAGTTCTACCCAAAGTG	875
ECSP_2870/2872	fw - TAGTTTGATTCTTGTTGGCGTTCG rv -TAAACCTAAAGGCAAACCGTCCTC	1967
ECSP_3286	fw - AACCGATAAGAAACAGTATCCCAG rv -TGCATGGTGTAACCTGCGGC	506
ECSP_3620	fw - CGTGACTGGGAAGTACGAGATT rv -GAAGTTATCCGGGACTTCACTC	431

Tabla 19. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar genes codificantes de factores putativos de virulencia.

<i>Target</i>	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo o elongación final (min)
ECSP_0242 ECSP_1773 ECSP_3286 ECSP_3620	95°C/05:00	Desnat. 94°C/01:00 Annealing 55°C/01:00 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/5:00
ECSP_2687	95°C/05:00	Desnat. 94°C/01:00 Annealing 57°C/01:00 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/5:00
ECSP_2870	95°C/05:00	Desnat. 94°C/01:30 Annealing 55°C/02:00 Elong. 72°C/02:00	30	72°C/10:00

Tabla 20. Distribución de genes codificantes de factores putativos de virulencia en los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.

No. de aislamiento	ECSP_ 0242	ECSP_ 1773	ECSP_ 2687	ECSP_ 2870/72	ECSP_ 3286	ECSP_ 3620
1	+	-	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	-	+	+	+	+
8	+	-	+	+	+	+
9	+	-	+	+	+	+
10	+	-	+	+	+	+
11	+	-	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	-	+	+
17	+	+	+	-	+	-
18	+	+	+	-	+	+
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+
22	+	-	+	-	+	+
23	+	-	+	+	-	-
24	+	-	+	-	+	+
25	+	+	+	-	+	+
26	+	-	+	+	+	+
27	+	-	+	-	-	+
28	+	-	+	-	+	+
29	+	-	+	-	+	+
30	+	+	+	-	-	-
31	+	+	-	-	+	-
32	+	-	+	-	+	+
33	+	-	+	+	+	+
34	+	+	+	-	+	+
35	+	-	+	-	+	+
36	+	-	+	-	+	+
37	+	-	+	-	+	+
38	+	-	+	-	-	+
39	+	+	+	-	-	-
40	+	+	+	-	+	-

No. de aislamiento	ECSP_0242	ECSP_1773	ECSP_2687	ECSP_2870/72	ECSP_3286	ECSP_3620
41	+	-	+	+	+	+
42	+	-	+	+	+	+
43	+	-	-	-	+	+

Figura 6. Distribución de genes codificantes de factores putativos de virulencia de acuerdo al origen de los aislamientos VTEC O157:H7.

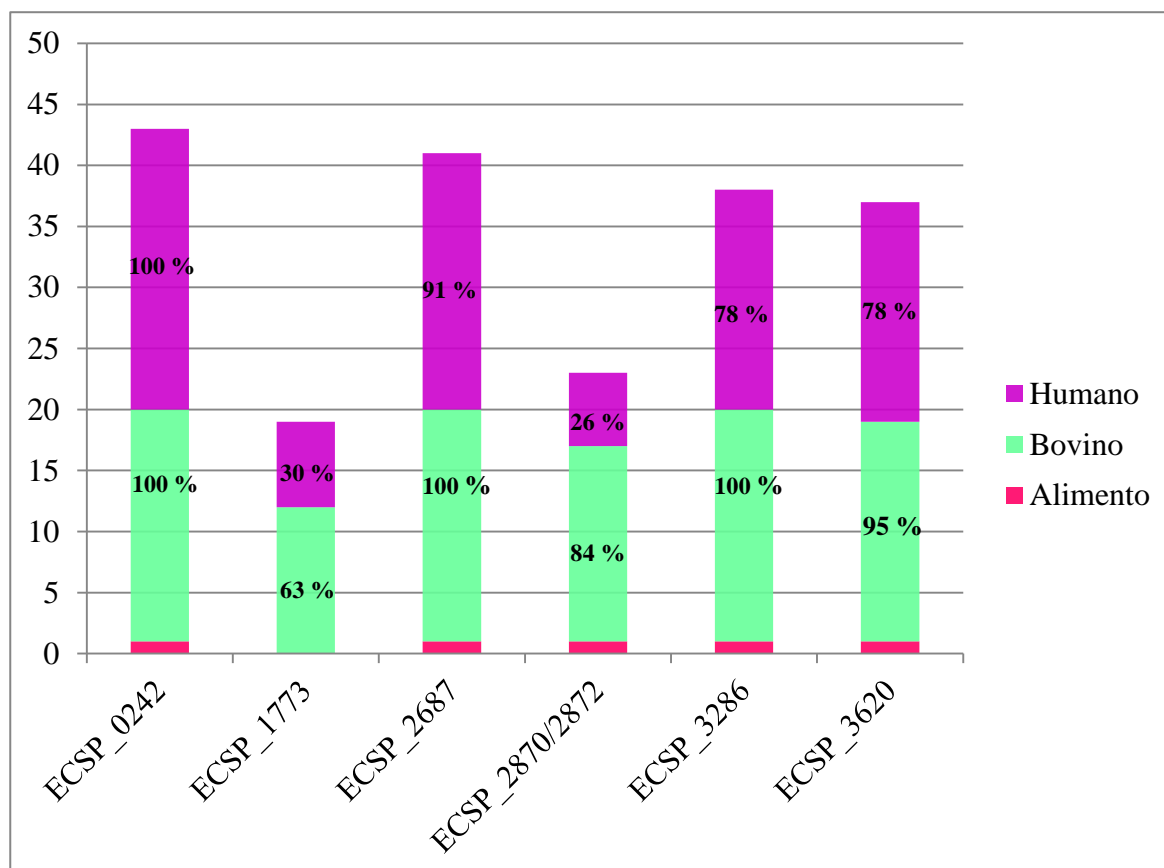
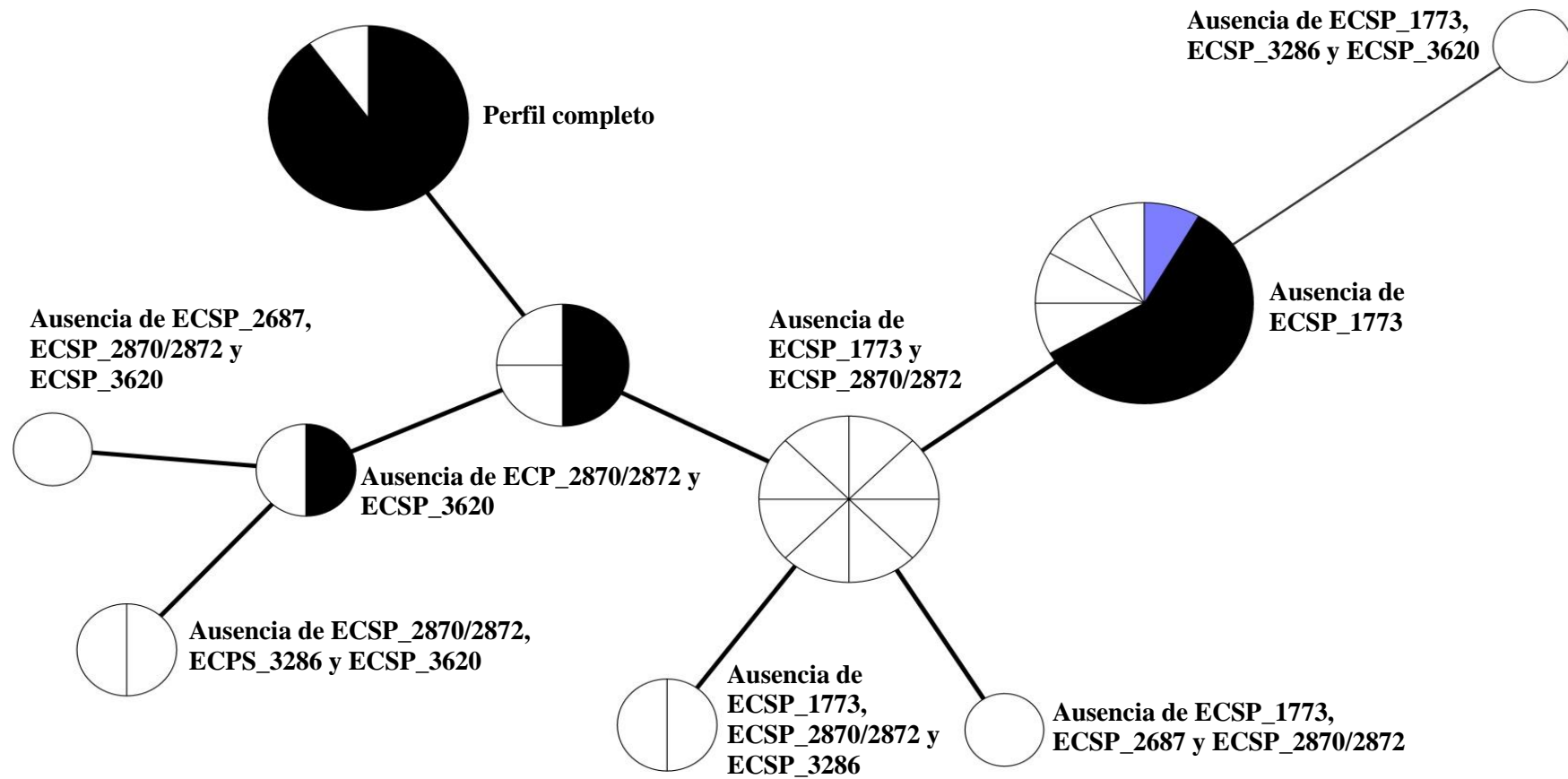


Figura 7. Análisis de agrupamiento (MST) de los aislamientos VTEC O157:H7, basado en los 6 genes que codifican factores putativos de virulencia. Cada círculo representa un perfil, el tamaño de cada círculo y las particiones en cada uno representa el número de aislamientos con cada perfil. Los colores identifican el origen de los aislamientos (blanco= humano, negro= bovino, azul= alimento).



2.5.2 Detección de genes plasmídicos que codifican factores de virulencia

Introducción:

Entre los factores de virulencia más importantes de VTEC O157:H7 se encuentran las Vtx. Sin embargo, se han descrito factores adicionales que contribuirían a potenciar su patogenicidad. Varios genes plasmídicos han sido previamente caracterizados. Los plásmidos son elementos genéticos móviles (MGE- *mobile genetic elements*) que confieren factores de virulencia a las bacterias patógenas. Cepas VTEC asociadas a enfermedad severa en el hombre, pertenecientes al mismo serotipo y que presentan igual tipo de PFGE, han podido discriminarse mediante la detección de genes codificados en plásmidos (Zhang *et al.*, 2000; Sonntag *et al.*, 2004).

La mayoría de los aislamientos clínicos de O157:H7 poseen un gran plásmido que porta factores de virulencia, llamado megaplásmido (93,3 kb) o plásmido enterohemorrágico (pO157) (Schmidt *et al.*, 1996; Burland *et al.*, 1998). El primer factor de virulencia descrito, codificado en pO157, fue la enterohemolisina de EHEC (EHEC-HlyA o EhxA) (Schmidt *et al.*, 1995), cuya función es liberar la hemoglobina presente en los glóbulos rojos, dándole a la bacteria una fuente de hierro (Schmidt *et al.*, 1995).

Otras proteínas codificadas en pO157 propuestas como factores de virulencia son, entre otras, una catalasa-peroxidasa (KatP), una serina-proteasa extracelular (EspP), una metaloproteasa de zinc (StcE) (Burland *et al.*, 1998). KatP podría contribuir en la colonización de los intestinos del huésped reduciendo el estrés oxidativo (Brunner *et al.*, 1996). EspP es una proteasa capaz de escindir la pepsina A y el factor V de coagulación humano. La degradación del factor V podría contribuir a la hemorragia de la mucosa observada en pacientes con CH (Brunner *et al.*, 1997). EspP también influye en la colonización intestinal de los terneros y en la adherencia a las células epiteliales intestinales de bovinos (Dziva *et al.*, 2007). La metaloproteasa de zinc StcE contribuye a la adhesión íntima de la bacteria a las células huésped, un proceso esencial en la colonización de mamíferos. Durante la infección, StcE actúa primero como mucinasa y luego como agente antiinflamatorio (Grys *et al.*, 2006).

También se han descrito otros genes plasmídicos codificantes de factores de virulencia de VTEC, presentes en otros plásmidos, entre ellos *epeA*, el cuál codifica una serín-proteasa que contribuiría en la colonización y adherencia al intestino del huésped (Leyton *et al.*, 2003), y los genes *subA* y *subB* que codifican una citotoxina subtilasa (Paton *et al.*, 2004).

Los genes plasmídicos analizados fueron los codificantes de serina-proteasas (*epeA* y *espP*), de una peroxidasa-catalasa (*katP*), una metalproteasa (*stcE*), y una citotoxina subtilasa (*subA*).

Materiales y métodos:

Se amplificaron mediante una PCR múltiple los genes plasmídicos *espP*, *katP*, *stcE*, *ehxA* y *subA* (Bustamante *et al.*, 2011) y por una reacción simple, el gen plasmídico *epeA* (Leyton *et al.*, 2003). Los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación se detallan en las Tablas 21 y 22.

El cóctel para la reacción múltiple de *espP*, *katP*, *stcE*, *ehxA* y *subA* incluyó solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 25 pmoles de cada *primer*, 1 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 2,5µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

El cóctel para la reacción simple de *epeA* incluyó solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 6,25 pmoles de cada *primer*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 2,5 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Las reacciones de PCR se efectuaron en dos cicladores térmicos programables: *T-17 Ivema* y *Multigene Optimax*. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio. Se sembraron 8 µl de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 20 minutos para la reacción simple y 40 minutos para la reacción múltiple, en *buffer* TBE 1x. La visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway). Como controles positivos se utilizaron las cepas EDL 933 (*espP*, *katP*, *stcE*, *ehxA*) y AP 28-1 (*espP*, *ehxA*, *subA*, *epeA*).

Resultados:

La totalidad de los aislamientos (n=43) mostró el perfil plasmídico *espP*, *katP*, *stcE* y *ehxA*. La presencia del gen *ehxA* había sido analizada en estudios anteriores (Padola *et al.*, 2004, Fernández *et al.*, 2009; 2012; Rivero *et al.*, 2010; Sanz, datos no publicados) y se confirmó en

esta tesis. Es decir que las subpoblaciones argentinas de VTEC O157:H7 de bovinos y de humanos no se diferencian desde el punto de vista de su perfil plasmídico.

Tabla 21. Secuencias de los *primers* empleados y tamaño de los productos amplificados para la identificación de genes plasmídicos que codifican factores de virulencia.

<i>Target</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	Tamaño del amplímero (pb)	Referencia
<i>katP</i>	fw -GCGCCAGTGGTGGTCAGCAA rv -ATATCGGGCTGCCGGTCCCA	914	Bustamante <i>et al.</i> , 2011
<i>espP</i>	fw -GCTGGCAACCAGCAACAGCG rv -CGGTAGCCCGCTTCTGCACC	774	
<i>stcE</i>	fw -GGCTCCGGAGGTGGGGGAAT rv -GAAGCCGGTGGAGGAACGGC	399	
<i>ehxA</i>	fw -ACAGCTGCAAGTGCGGGTCTG rv -GGGATGCACTGGAGGCTGCAC	262	
<i>subA</i>	fw -TATGGCTTCCCTCATTGCC rv -TATAGCTGTTGCTTCTGACG	556	Paton <i>et al.</i> , 2004
<i>epeA</i>	fw -CACCTGTAGAATCTTA rv -CTGAATAAATCCAGCCC	576	Leyton <i>et al.</i> , 2003

Tabla 22. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar genes plasmídicos codificantes de factores de virulencia.

<i>Target</i>	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo o elongación final (min)
<i>katP</i> <i>espP</i> <i>stcE</i> <i>ehxA</i> <i>subA</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 58°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/5:00
<i>epeA</i>	95°C/02:00	Desnat. 94°C/01:00 Annealing 46°C/00:50 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/5:00

2.5.3 Detección de genes efectores no codificados en LEE (*nle*)

Introducción:

Varios determinantes de virulencia asociados a la patogénesis de la infección con VTEC están codificados en islas de patogenicidad (PAI) cromosómicas, como la ya nombrada LEE (*locus of enterocyte effacement*). Las PAI constituyen un pool génico dinámico, contribuyen a la evolución y a la virulencia de los microorganismos y pueden ser usadas como una “marca” genética de patógenos emergentes (Coombes *et al.*, 2008). En cepas VTEC se han encontrado además de LEE, otras PAI potenciales como por ejemplo OI-36, OI-57, OI-71 y OI-122. En las mismas se encuentran genes “efectores no codificados en LEE” (*nle*), los cuales codifican proteínas efectoras que son translocadas dentro de la célula huésped por el sistema de secreción de tipo III (codificado en LEE) (Coombes *et al.*, 2008; Bugarel *et al.*, 2010; Konczy *et al.*, 2008). Éstas interfieren en la respuesta inmune del hospedador durante la infección con VTEC, resultando clave en la virulencia en humanos luego de la transmisión zoonótica.

Las cepas VTEC O157:H7 presentan un repertorio variable de genes codificantes de factores de virulencia, incluidos los *nle* (Kim *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 2005; Bugarel *et al.*, 2010). La evaluación de riesgo molecular (MRA) basada en el estudio del contenido de genes *nle* permite predecir el potencial riesgo que estas cepas representan para la salud pública (Coombes *et al.*, 2008). El *screening* genético de los efectores secretados por el sistema de tipo III (*Nle*) indica, además, que algunos de ellos contribuyen a la colonización y persistencia de VTEC en el ganado (Dziva *et al.*, 2004; van Diemen *et al.*, 2005). Esta información tiene importantes implicancias en lo que a salud pública se refiere ya que la persistencia de cepas en la población animal aumenta las posibilidades de transmisión zoonótica y ambiental (Coombes *et al.*, 2008).

Materiales y métodos:

Se amplificaron por PCR los genes *nleB2*, *nleC*, *nleH1-1*, *nleD* (codificados en O-I 36); *nleG2-3*, *nleG5-2*, *nleG6-2* (O-I 57); *nleA*, *nleH1-2*, *nleF*, *nleG*, *nleG2-1*, *nleG9* (O-I 71); *nleB*, *nleE*, *ent/esp L2* (O-I 122), los cuales codifican para efectores del sistema de secreción tipo III (Tabla 23) (Deng *et al.*, 2004; Tobe *et al.*, 2006; Wickham *et al.*, 2006). Los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación de detallan en las tablas 24 y 25.

Los cócteles para las reacciones simples de PCR incluyeron solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 6,25 pmol de cada *primer*, 0,5 U de

ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Las reacciones de PCR se efectuaron en dos cicladores térmicos programables: *T-17 Ivema* y *Multigene Optimax*. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Se sembraron 8 µl de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 20 minutos en *buffer* TBE 1x. La visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway).

En base a los perfiles genéticos obtenidos para cada aislamiento se construyó una red de tipo MST, utilizando el software BioNumerics vs. 6.6 (*Applied-Maths*).

Resultados:

Todos los aislamientos O157:H7 analizados presentaron genes *nle*. Los genes *nleB2*, *nleC* y *ent/esp L2*, en particular, se encontraron presentes en el 100% de los aislamientos analizados (Tabla 26, Figura 8). Se observó una alta prevalencia de genes *nle* y una distribución similar de los mismos, independientemente del origen de los aislamientos (Figura 8). El gen menos prevalente en aislamientos de ambos orígenes fue *nleF*, de la OI-71. Este se presentó en un 43 % de los aislamientos de origen humano y en un 47 % de los de origen bovino. El aislamiento O157:H7 proveniente de una hamburguesa (N° 1), presentó el perfil *nle* completo.

Los aislamientos se agruparon en 11 perfiles (Figura 9). El perfil *nle* más prevalente (46 %) fue el positivo para todos los genes *nle*. El segundo perfil predominante mostró la OI-71 incompleta, particularmente carente de *nleF* (26 %) (Figura 9). Cada uno de los perfiles restantes fue detectado en uno o dos aislamientos. No se observaron perfiles origen-específicos. Los dos perfiles que agruparon la mayoría de los aislamientos fueron compartidos por aislamientos de ganado y humanos.

Tabla 23. Genes de virulencia codificados en las islas de patogenicidad (PAI) estudiadas. Referencias: Karmali *et al.*, 2003; Coombes *et al.*, 2008; Konczy *et al.*, 2008; Franz *et al.*, 2015.

PAI	Target	Proteína o efector codificado
OI-36	<i>nleB2</i>	Efector tipo III no codificado LEE
	<i>nleC</i>	Inmunomodulación, metaloproteasa de zinc
	<i>nleH1-1</i>	Inmunomodulación
	<i>nleD</i>	Inmunomodulación, metaloproteasa de zinc
OI-57	<i>nleG2-3</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nleG5-2</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nleG6-2</i>	Ubiquitina ligasa
OI-71	<i>nleA</i>	Interrupción de uniones estrechas y tráfico de proteínas
	<i>nleF</i>	Interrupción de tráfico de proteínas
	<i>nleG</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nleG2-1</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nleG9</i>	Ubiquitina ligasa
	<i>nleH1-2</i>	Inmunomodulación
OI-122	<i>nleB</i>	Inmunomodulación
	<i>nleE</i>	Inmunomodulación
	<i>ent/esp L2</i>	Formación de microcolonía y agregación de actina F

Tabla 24. Secuencias de los *primers* empleados y tamaño de los productos amplificados para la identificación de genes de virulencia ubicados en islas de patogenicidad. Adaptado de Coombes y colaboradores, 2008.

<i>Target</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	Tamaño del amplímero (pb)
<i>nleB2</i>	fw -GTTAATACTAAGCAGCATCC rv -CCATATCAAGATAGATACACC	475
<i>nleC</i>	fw -ACAGTCCAACCTTCAACTTTTCC rv -ATCGTACCCAGCCTTTCG	777
<i>nleH1-1</i>	fw -GTTACCACCTTAAGTATCC rv -GTTTCTCATGAACACTCC	456
<i>nleD</i>	fw -GGTATTACATCAGTCATCAAGG rv -TTGTGGAAAACATGGAGC	426
<i>nleG2-3</i>	fw -GGATGGAACCATACCTGG rv -CGCAATCAATTGCTAATGC	551
<i>nleG5-2</i>	fw -TGGAGGCTTTACGTCATGTCG rv -CCGGAACAAAGGGTTCACG	504
<i>nleG6-2</i>	fw -CGGGTCAGTGGATGATATGAGC rv -AAGTAGCATCTAGCGGTCGAGG	424
<i>nleA</i>	fw -ATGAACATTCAACCGACCATAC rv -GACTCTTGTTTCTTGGATTATATCAAA	1296
<i>nleF</i>	fw -ATGTTACCAACAAGTGGTTCTTC rv -ATCCACATTGTAAAGATCCTTTGTT	567
<i>nleG</i>	fw -ATGTTATCGCCCTCTTCTATAAAT rv -ACTTAATACTACACTAATAAGATCCA	902
<i>nleG2-1</i>	fw -ACCAGAAACCTGACTTCG rv -CAGCATCTTCATATACTACAGC	406
<i>nleG9</i>	fw -GTTTCGTGCCCCGAATTGTAGC rv -CACCAACCAAACGAGAAAATG	409
<i>nleH1-2</i>	fw -AACGCCTTATATTTTACC rv -AGCACAATTATCTCTTCC	589
<i>nleB</i>	fw -GGAAGTTTGTTTACAGAGACG rv -AAAATGCCGCTTGATACC	297
<i>nleE</i>	fw -GTATAACCAGAGGAGTAGC rv -GATCTTACAACAAATGTCC	260
<i>ent/esp L2</i>	fw -GAATAACAATCACTCCTCACC rv -TTACAGTGCCCGATTACG	233

Tabla 25. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar los genes de virulencia presentes en las islas de patogenicidad estudiadas.

<i>Target</i>	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo elongación final (min)
<i>nleB2, nleH1-2, nleE, ent/esp L2</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 52°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/10:00
<i>nleC, nleH1-1, nleD, nleG5-2, nleG6-2, nleG, nleG2-1, nleG9</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 55°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/10:00
<i>nleG2-3</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 56°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/10:00
<i>nleA, nleF, nleB</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 58°C/01:00 Elong. 72°C/02:30	30	72°C/5:00

Tabla 26. Distribución de genes *nle* en los aislamientos O157:H7 estudiados.

No. de aislamiento	OI-36				OI-57			OI-71						OI-122		
	<i>nleB2</i>	<i>nleC</i>	<i>nleH1-1</i>	<i>nleD</i>	<i>nleG2-3</i>	<i>nleG5-2</i>	<i>nleG6-2</i>	<i>nleA</i>	<i>nleF</i>	<i>nleG</i>	<i>nleG2-1</i>	<i>nleG9</i>	<i>nleH1-2</i>	<i>nleB</i>	<i>nleE</i>	<i>ent/espL2</i>
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
18	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
19	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
20	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

No. de aislamiento	OI-36				OI-57			OI-71						OI-122		
	<i>nleB2</i>	<i>nleC</i>	<i>nleH1-1</i>	<i>nleD</i>	<i>nleG2-3</i>	<i>nleG5-2</i>	<i>nleG6-2</i>	<i>nleA</i>	<i>nleF</i>	<i>nleG</i>	<i>nleG2-1</i>	<i>nleG9</i>	<i>nleH1-2</i>	<i>nleB</i>	<i>nleE</i>	<i>ent/espL2</i>
25	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
36	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
43	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+

Figura 8. Distribución de los genes *nle* en las diferentes islas de patogenicidad de acuerdo al origen de los aislamientos.

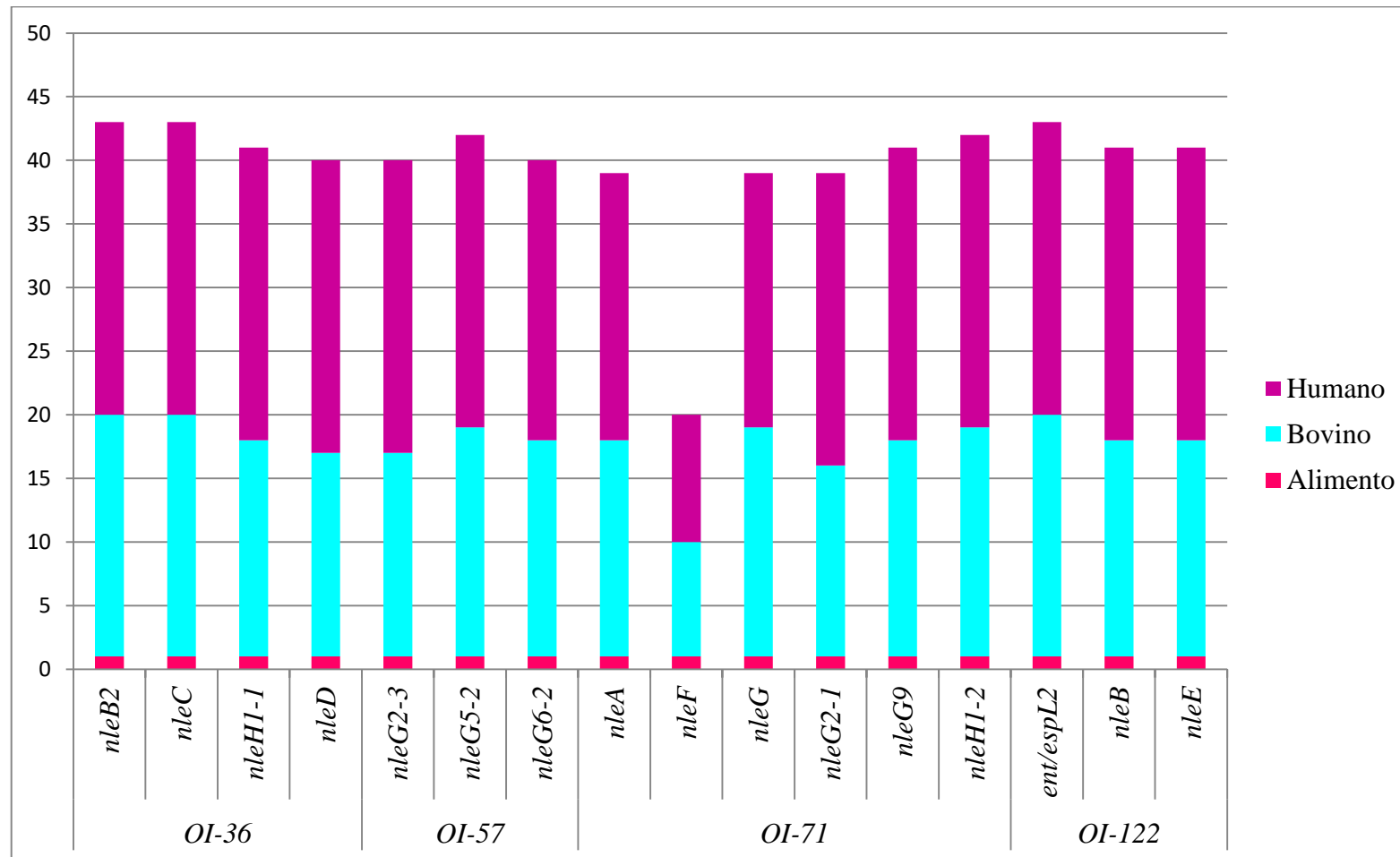
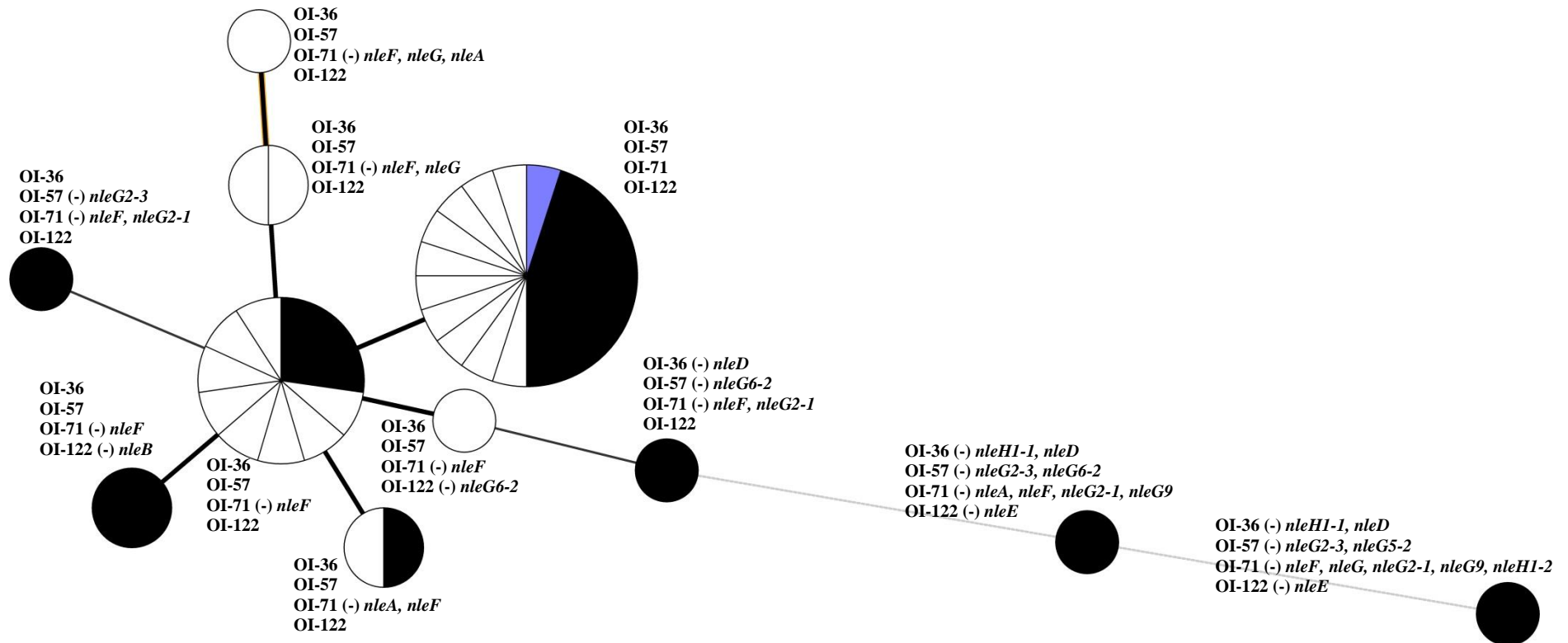


Figura 9. Análisis de agrupamiento (MST) de los aislamientos VTEC O157:H7, basado en 16 genes *nle*. Cada círculo representa un perfil *nle*; el tamaño de cada círculo y las particiones en cada uno representa el número de aislamientos con cada perfil. Los colores identifican el origen de los aislamientos (blanco= humano, negro= bovino, azul= alimento). Los perfiles *nle* conectados por una línea sólida se diferencian entre sí por 1 gen *nle*, mientras que el perfil *nle* conectado por una delgada línea sólida difiere en 2 genes *nle*. Los perfiles *nle* que difieren entre sí por 3 o más genes *nle* están conectados por líneas más finas.



2.5.4 Detección de genes que codifican factores de adherencia

Introducción:

Para desarrollar el proceso infeccioso, VTEC O157:H7 inicialmente debe adherirse a las células epiteliales del intestino del huésped. Se han reconocido distintos factores de adherencia presentes en cepas VTEC O157:H7 que median dicho proceso, como EhaA, ELF, IHA, Lpf, entre otros. EhaA es una proteína autotransportadora identificada inicialmente en cepas EHEC O157:H7 que contribuye a la adhesión y formación de *biofilm* (Wells *et al.*, 2008). ELF (fimbria de unión a laminilla de *E. coli*) funciona como un factor de adherencia accesorio, que junto con otras adhesinas contribuye a la adherencia de VTEC O157:H7; proporcionando ventajas ecológicas para sobrevivir en diferentes hospedadores y en el ambiente (Samadder *et al.*, 2009). Iha (adhesina homóloga a IrgA) es una proteína que confiere adherencia a la bacteria; se encuentra codificada por el gen *iha*, presente en una isla cromosómica altamente conservada (Tarr *et al.*, 2000). Las Lpf (fimbrias polares largas) constituyen un importante factor de colonización de VTEC O157:H7. En estas cepas se han distinguido dos *loci lpf* no idénticos, que codifican estructuras fimbriales altamente reguladas, homólogas a Lpf de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Torres *et al.*, 2002; 2004). Se han identificado polimorfismos en los genes *lpfA1* y *lpfA2*, los cuales permiten clasificar las principales subunidades fimbriales en distintas variantes. Las variantes *lpfA1-3* y *lpfA2-2* prevalecen en cepas del serotipo O157:H7 (Torres *et al.*, 2009).

Materiales y métodos:

Se amplificaron por PCR los genes *ehaA*, *elfA*, *iha*, *lpfA1-3* y *lpfA2-2*, utilizando los *primers* detallados en la tabla 27.

Los cócteles para las reacciones simples incluyeron una solución de *buffer* de *Taq* polimerasa 1x, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2,5 pmoles de cada *primer* para *ehaA*, *ihA* y *lpfA1* y *lpfA2*, 12,5 pmoles de cada primer de *elfA*, 0,5 U de ADN *Taq* polimerasa (InBio, Highway) y 3 µl de extracto de ADN, en un volumen final de 25 µl.

Las condiciones de termociclado que se implementaron en cada PCR para la detección de los 5 genes, se obtuvieron a partir de la puesta a punto correspondiente y se observan en la Tabla 28.

Las reacciones de PCR se efectuaron en dos cicladores térmicos programables: *T-17 Ivema* y *Multigene Optimax*. Los productos de amplificación fueron analizados mediante

electroforesis en geles de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio. Se sembraron 8 µl de cada muestra conteniendo *loading buffer* 1x. La corrida electroforética se realizó en una cuba horizontal de 20 cm a 100 V, durante aproximadamente 20 minutos en *buffer* TBE 1x. La visualización de las bandas en el gel se realizó mediante iluminación con luz UV. El tamaño de las bandas se determinó comparando los productos amplificados con el marcador de peso molecular de ADN 100-1000 pb (D0017 InBio, Highway).

Resultados:

La totalidad de las cepas VTEC O157:H7 estudiadas fueron positivas para los genes *ehaA*, *elfA*, *iha* y variantes de *lpfA* *lpfA1-3* y *lpfA2-2*, los cuales codifican adhesinas responsables de la adherencia bacteriana al intestino.

Tabla 27. Secuencias de los *primers* empleados y tamaño de los productos amplificados para la identificación de genes que codifican factores de adherencia.

<i>Target</i>	<i>Primers (5'-3')</i>	Tamaño del amplímero (pb)	Referencia
<i>ehaA</i>	fw -AGGCATGAGACACGATC rv -AAGTCGTGCCATTGAGC	500	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>elfA</i>	fw -ACGATGAAAAAAGTGTATTGACGG rv -CCGCATTACATTACCAGAA	180	Hernandes <i>et al.</i> , 2011
<i>iha</i>	fw -CAAATGGCTCTCTTCCGTCAATGC rv -CAGGTCGGGGTTACCAAGT	925	Tarr <i>et al.</i> , 2000
<i>lpfA1-3</i>	fw -GGTTGGTGACAAATCCCCG rv -CGTCTGGCCTTTACTCAGA	244	Torres <i>et al.</i> , 2009
<i>lpfA2-2</i>	fw -CTACAGGCGGCTGATGGAACA rv -GCTAATACCAGCGGCAGCATCGT	297	

Tabla 28. Condiciones de termociclado utilizadas para amplificar genes que codifican factores de adherencia.

<i>Target</i>	Temp/Tiempo desnaturalización inicial (min)	Ciclos Temp/Tiempo (min)	Cantidad de ciclos	Temp/Tiempo elongación final (min)
<i>ehaA</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 55°C/00:30 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/10:00
<i>elfA</i>	95°C/05:00	Desnat. 94°C/00:45 Annealing 60°C/00:45 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/10:00
<i>iha</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/01:00 Annealing 55°C/01:00 Elong. 72°C/01:00	30	72°C/10:00
<i>lpfA1-3,</i> <i>lpfA2-2</i>	94°C/05:00	Desnat. 94°C/00:30 Annealing 57°C/00:30 Elong. 72°C/00:30	30	72°C/10:00

SECCIÓN EXPERIMENTAL III:

Evaluación de citotoxicidad de aislamientos nativos VTEC O157:H7

2.6 Objetivo: Evaluar la citotoxicidad de aislamientos VTEC O157:H7.

Introducción:

El ensayo de citotoxicidad en la línea celular Vero se utiliza como método estándar para la titulación de las verotoxinas y la evaluación de sus efectos citotóxicos (Konowalchuk *et al.*, 1977).

Para caracterizar fenotípicamente y comparar la citotoxicidad de aislamientos VTEC O157:H7 de ganado y humanos en Argentina, se evaluó la actividad citotóxica de los sobrenadantes de cultivos de los distintos aislamientos sobre la línea celular Vero, según el protocolo descrito por Fernández y colaboradores (2013).

Materiales y métodos:

La citotoxicidad de los aislamientos O157:H7 se evaluó mediante un ensayo en monocapa de células Vero. Un ansada del cultivo congelado de cada aislamiento se creció en 10 ml de caldo Luria-Bertani (LB), a 37 °C con agitación orbital (100 rpm) por un período de 18 hs. Alícuotas de los cultivos *over night* fueron centrifugadas a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y los sobrenadantes se guardaron a -20 °C hasta el momento del ensayo.

Las células Vero se cultivaron en placas de 96 pocillos con medio esencial mínimo con solución salina de Earle (MEM), estreptomicina 200 mg/l, penicilina 100 mg/l (Sigma) y suero fetal bovino (Gibco) al 10 %; en estufa de cultivo a 37 °C y atmósfera con 5 % de CO₂, por 48 a 72 hs hasta obtener una confluencia del 100 %.

Los sobrenadantes de cada aislamiento, en dos diluciones (1/10 y 1/5) y por duplicado, se enfrentaron a la monocapa de células Vero. La cepa EDL 933 fue utilizada como control positivo. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ durante 48 hs. Las células se fijaron y tiñeron con una solución de formaldehído 10 % y de cristal violeta 0,2 % en PBS (*phosphate buffered saline*- buffer fosfato salino) durante 20-30 min y se observaron con microscopio invertido.

Los pocillos con destrucción celular parcial (80 o 20 %) o total (100 %) se consideraron positivos. Los pocillos sin destrucción celular fueron considerados negativos.

El análisis estadístico del efecto citotóxico de los aislamientos de distintos orígenes estudiados, se realizó utilizando el software Epi Info™ 7.1.5.2 por tablas de contingencia de 2 x 2, Prueba de *Chi*-Cuadrado (X^2) y Prueba Exacta de Fisher, con un nivel de confianza del 95 %.

Resultados:

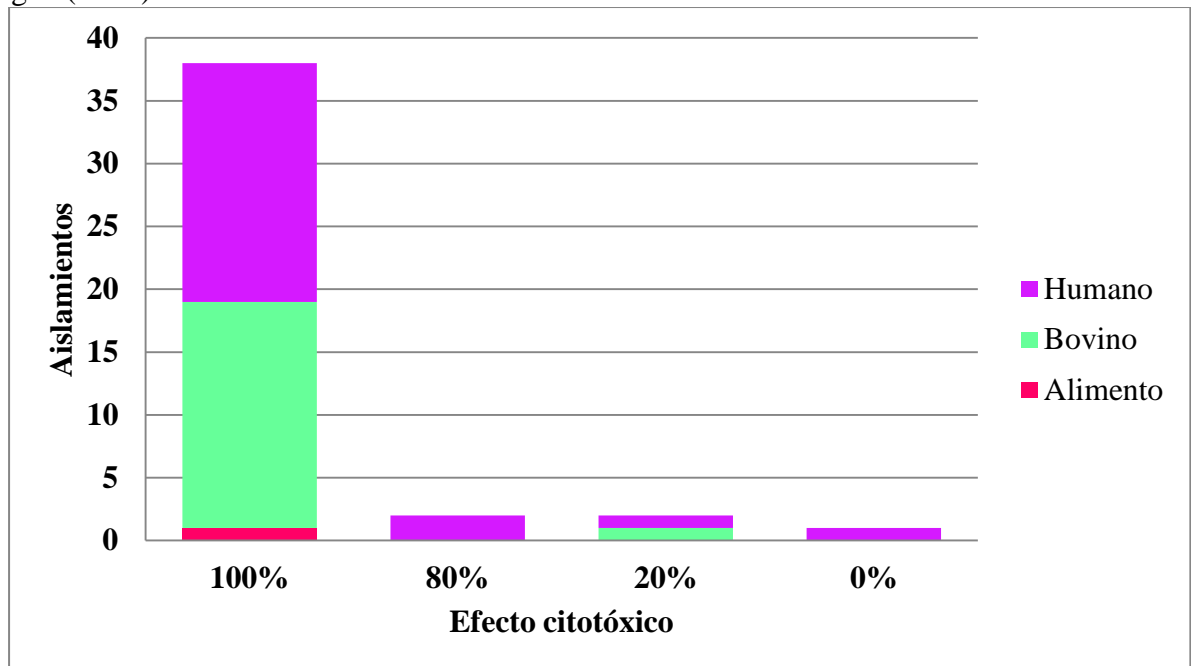
Se evaluó la actividad citotóxica de los sobrenadantes de cultivos de los 43 aislamientos VTEC O157:H7. Todos los sobrenadantes, excepto el identificado como linaje II (aislamiento N° 28), demostraron efecto citotóxico después de 48 horas de inoculación en células Vero (Tabla 29). Treinta y ocho aislamientos (88 %) mostraron destrucción celular total (100 % de citotoxicidad) y cuatro aislamientos (10 %), destrucción parcial de células [80 % de citotoxicidad (aislamientos N° 36 y 37), o 20 % de citotoxicidad (aislamientos N° 6 y 35)] (Figura 10). No se observó asociación significativa entre el efecto citotóxico y el origen de las cepas (OR=0,84 - $P>0,05$).

Tabla 29. Resultados del ensayo de citotoxicidad de aislamientos VTEC O157:H7.

No. de aislamiento	Origen	Efecto citotóxico (%)
1	Alimento	100
2		100
3		100
4		100
5		100
6		20
7		100
8		100
9		100
10		100
11	Bovino	100
12		100
13		100
14		100
15		100
16		100
17		100
18		100
19		100
20		100
21	Humano	100
22		100
23		100
24		100
25		100
26		100
27		100
28		0
29		100
30		100
31		100
32		100
33		100
34		100
35		20
36		80
37		80
38		100
39		100
40		100
41		100

No. de aislamiento	Origen	Efecto citotóxico (%)
42	Humano	100
43		100

Figura 10. Efecto citotóxico de aislamientos VTEC O157:H7 de Argentina discriminado por origen (en %).



SECCIÓN EXPERIMENTAL IV:

2.7 Análisis comparativo de los datos obtenidos en relación al origen de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados

Objetivo:

El objetivo de esta sección fue realizar un análisis comparativo de los aislamientos estudiados en relación al origen, teniendo en cuenta los resultados de los múltiples caracteres analizados.

Materiales y métodos:

Para el análisis comparativo de los caracteres estudiados se construyeron matrices de similitud y se aplicaron diferentes índices, dependiendo del tipo de datos (binarios, categóricos, etc). Las relaciones entre los aislamientos se visualizaron mediante la construcción de árboles por UPGMA. Toda esta información se analizó mediante el software BioNumerics vs. 6.6 (*Applied-Maths*).

El análisis estadístico de la frecuencia de marcadores genéticos y subtipos asociados al reservorio bovino o con una incrementada virulencia en humanos hallados entre los aislamientos de distintos orígenes estudiados, se realizó utilizando el software Epi Info™ 7.1.5.2 por tablas de contingencia de 2 x 2, Prueba de *Chi-Cuadrado* (X^2) y Prueba Exacta de Fisher, con un nivel de confianza del 95 % (Tabla 31, 32). Se determinaron distintos valores de *Odds Ratio* (OR). El OR expresa la posibilidad de ocurrencia de un evento de interés usando probabilidades, y siendo una asociación significativa cuando el valor de OR resultante del análisis es >1 (Cerdeira *et al.*, 2013).

Resultados:

El 98 % de los aislamientos estudiados (n=42) fueron asignados al linaje intermedio I/II, mayormente asociado a cepas hipervirulentas (Laing *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009). Sólo un aislamiento, llamativamente proveniente de un caso de SUH (N° 28), fue asignado al linaje II, subpoblación asociada al reservorio bovino. No se halló una asociación significativa en cuanto a la pertenencia al linaje I/II y el origen de los aislamientos ($P>0,05$). Es decir, nuestros resultados mostraron que el linaje I/II es prevalente tanto en aislamientos de humanos como de bovinos y alimentos.

Cuando se analizó, por PCR- RFLP, el gen *rhsA* para la asignación de cepas al clado 8 se observó que la totalidad de los aislamientos presentaron el alelo C, característico del clado 8 hipervirulento. Por lo tanto, no se encontró una asociación significativa entre la asignación al clado 8 y el origen de las muestras ($P>0,05$). Es decir, los aislamientos O157:H7 estudiados representan un grupo homogéneo en relación a la asignación a clados.

Por otra parte, y en coincidencia con los marcadores anteriormente descriptos, en el sub-*set* de aislamientos O157:H7 que se pudo analizar para la detección del polimorfismo presente en el gen *tir* (*tir* 255 T>A) ($n=36$), el 92 % de los aislamientos presentó el alelo T, el cuál en la bibliografía se encuentra fuertemente asociado a subpoblaciones de O157:H7 con una incrementada virulencia en humanos (Bono *et al.*, 2007). En este estudio no se halló una asociación significativa en cuanto a la presencia del alelo T y el origen de los aislamientos ($OR=1,55 - P>0,05$). Sólo 3 aislamientos presentaron el alelo *tir* 255 T>A A, uno de origen bovino (N° 15) y dos de origen humano obtenidos de pacientes con SUH (N° 40, 41), mientras que el alelo T se encontró tanto en aislamientos de origen humano (90 %) como en aislamientos bovinos (93 %).

En relación a la asignación de grupos filogenéticos, el 95,4 % de los aislamientos O157:H7 estudiados fue asignado al filogrupo E, mientras que solo un aislamiento (N° 27), proveniente de un paciente con SUH, fue asignado al grupo filogenético A y otro, de un paciente con diarrea acuosa, no pudo ser asignado a ningún grupo (N° 35). No se observó asociación significativa entre los aislamientos asignados al filogrupo E y el origen de los mismos ($OR=1,55 - P>0,05$).

En conclusión, no se halló una asociación significativa entre los distintos linajes, la pertenencia al clado 8, la presencia del alelo T en *tir* y los grupos filogenéticos hallados, en relación al origen de los aislamientos O157:H7 estudiados (Tabla 30). Ello significa que la población de O157:H7 es un grupo genotípicamente homogéneo en cuanto a estos marcadores.

Cuando se comparó la distribución de factores de virulencia con el origen de los aislamientos O157:H7 (Tabla 31), resultó que la totalidad de los aislamientos, tanto de origen bovino, humano o de alimentos, presentaron perfiles idénticos en relación a la presencia de genes plasmídicos (*espP*, *katP*, *stcE*, *ehxA*) y de genes que codifican factores de adherencia (*ehaA*, *elfA*, *iha*, *lpfA1-3*, *lpfA2-2*).

En relación a los genes *nle*, sí se detectaron diferentes perfiles, un total de 11, y una alta prevalencia de estos genes. Sin embargo, tampoco se halló asociación significativa en cuanto a la presencia de genes *nle* y el origen de los aislamientos ($P>0,05$) (Tabla 31). Los dos perfiles que

agruparon la mayoría de los aislamientos fueron compartidos por aislamientos de ganado y humanos.

A diferencia de todos los marcadores mencionados previamente, el análisis de genes que codifican FPV mostró asociación entre ciertos genes y el origen de las muestras, particularmente ECSP_1773 (codifica una proteína que reduce la expresión de citoquinas) y ECSP_2870/2872 (gen de adaptación reguladora a células hospedadoras vegetales) (Figura 6). Ambos fueron significativamente asociados a aislamientos de origen bovino ($P<0,05$) (Tabla 31), mostrando ECSP_2870/2872 una asociación mayor que ECSP_1773 (OR=15,11 vs OR=3,91 respectivamente).

Por el MLVA se registraron 36 perfiles diferentes, 33 de los cuales fueron únicos. El análisis de agrupamiento por UPGMA realizado en base a los resultados de MLVA, reflejó una alta diversidad genética entre los aislamientos VTEC O157:H7 circulantes en la región pampeana de Argentina (Figura 11).

Cuando se analizaron los datos de MLVA junto con los de FPV y *nle*, se observó que 6 aislamientos obtenidos de bovinos de pastoreo (N° 7, 8, 9, 10, 11 y 12) con relación temporo-espacial, presentaron idéntico perfil MLVA, y que 4 de estos aislamientos (N° 7, 9, 10 y 11) presentaron, además, idéntico perfil de virulencia (para FPV y positivos para todos los genes *nle*) (Figura 11). Con esta información podría inferirse que los aislamientos N° 7, 9, 10 y 11 poseen relación clonal. Los aislamientos N° 2 y 4 obtenidos de bovinos de *feedlot*, con relación temporo-espacial, presentaron iguales perfiles de MLVA y de genes codificantes de FPV, sin embargo, pudieron diferenciarse por sus perfiles *nle* (Figura 11). En relación a los aislamientos N° 36 y 38, si bien compartieron perfil MLVA, ello fue debido al azar y no a la existencia de una relación clonal, ya que el primero fue aislado en 2008 de un niño asintomático (cuyo hermano presentó SUH) y el segundo, al año siguiente, de un paciente con SUH. Además, estos aislamientos también pudieron diferenciarse en relación a sus perfiles de genes codificantes de FPV (Figura 11).

De los 23 aislamientos obtenidos de humanos, el 56,5 % provino de pacientes con SUH, mientras que el resto de estos aislamientos fue obtenido de pacientes que presentaron otras patologías, como diarrea con sangre o diarrea acuosa (Anexo I) y, uno (N° 36), de un niño asintomático. Se evaluó la distribución y asociación de genes codificantes de FPV y de genes *nle* entre los aislamientos de origen humano que habían o no provocado SUH, no hallándose asociación entre la presencia de algún gen o perfil de virulencia específico y los aislamientos obtenidos de pacientes con SUH ($P>0,05$) (Tabla 32).

Tabla 30. Distribución y asociación de subtipos de VTEC O157:H7 de acuerdo al origen de los aislamientos estudiados.

Subtipos	No. (%) de aislamientos				Análisis de asociación entre el subtipo y el origen del aislamiento	
	Total	Bovino	Humano	Alimento	Bovino	
					OR ^a (95% CI)	P
Linaje I/II	42 (97,7)	19 (100)	22 (95,6)	1 (100)	Indefinido	>0,05
Clado 8	43 (100)	19 (100)	23 (100)	1 (100)	Indefinido	>0,05
Alelo T en <i>tir</i> ^b	33 (91,6)	17 (89)	23 (100)	1 (100)	Indefinido	>0,05
Filogrupo E	41 (95)	19 (100)	21 (91)	1 (100)	1,55	>0,05

^a*Odds ratios*: indica si es más (>1) o menos (<1) probable que un subtipo se encuentre asociado con el origen bovino en comparación con los aislamientos de origen humano.

^bEn relación a la detección de alelo T en *tir*, se obtuvieron resultados sólo de un sub-*set* de muestras (n=36).

Tabla 31. Distribución y asociación de factores de virulencia de acuerdo al origen de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados.

Perfil genético		No. (%) de aislamientos que presentan el factor de virulencia				Análisis de asociación entre la presencia del gen que codifica el factor de virulencia y el origen del aislamiento	
		Total	Bovino (n=19)	Humano (n=23)	Alimento (n=1)	Bovino	
						OR ^a (95% CI)	P
Genes FPV	ECSP-0242	43 (100)	19 (100)	23 (100)	1 (100)	-	-
	ECSP-1773	19 (44)	12 (63)	7 (30)	-	3,91	<0,05
	ECSP-2687	41 (95)	19 (100)	21 (91)	1 (100)	Indefinido	>0,05
	ECSP-2870/2872	23 (53)	16 (84)	6 (26)	1 (100)	15,11	<0,05
	ECSP-3286	38 (88)	19 (100)	18 (78)	1 (100)	Indefinido	<0,05
	ECSP-3620	37 (86)	18 (95)	18 (78)	1 (100)	Indefinido	>0,05
O-I 36	<i>nleB2</i>	43 (100)	19 (100)	23 (100)	1 (100)	-	-
	<i>nleC</i>	43 (100)	19 (100)	23 (100)	1 (100)	-	-
	<i>nleH1-1</i>	41 (95)	17 (89)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05
	<i>nleD</i>	41 (95)	17 (89)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05
O-I 57	<i>nleG2-3</i>	40 (93)	16 (84)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05
	<i>nleG5-2</i>	42 (98)	18 (95)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05
	<i>nleG6-2</i>	40 (93)	17 (89)	22 (96)	1 (100)	0,3863	>0,05
O-I 71	<i>nleA</i>	39 (91)	17 (89)	21 (91)	1 (100)	0,8095	>0,05
	<i>nleF</i>	20 (46)	9 (47)	10 (43)	1 (100)	1,17	>0,05
	<i>nleG</i>	39 (91)	18 (95)	20 (87)	1 (100)	2,7	>0,05
	<i>nleG2-1</i>	39 (91)	15 (79)	23 (100)	1 (100)	0	<0,05
	<i>nleG9</i>	41 (95)	17 (89)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05
	<i>nleH1-2</i>	42 (98)	18 (95)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05
O-I 122	<i>ent/espL2</i>	43 (100)	19 (100)	23 (100)	1 (100)	-	-
	<i>nleB</i>	41 (95)	17 (89)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05
	<i>nleE</i>	41 (95)	17 (89)	23 (100)	1 (100)	0	>0,05

^aOdds ratios: indica si es más (>1) o menos (<1) probable que un gen o variante alélica esté asociado con el origen bovino en comparación con los aislamientos de origen humano.

Figura 11. Análisis de agrupamiento por UPGMA de aislamientos VTEC O157:H7 en base a perfiles de MLVA. Se muestran, además, la presencia (en negro) o ausencia (en blanco) de genes que codifican FPV y genes *nle*. Se excluyeron de este análisis aquellos genes con 100% de prevalencia. Se encuentran resaltados en celeste, amarillo y verde aquellos perfiles MLVA compartidos. Dentro de cada *cluster* MLVA, se resaltan en otros colores aquellos aislamientos que se diferencian en cuanto al perfil de genes que codifican factores de virulencia.

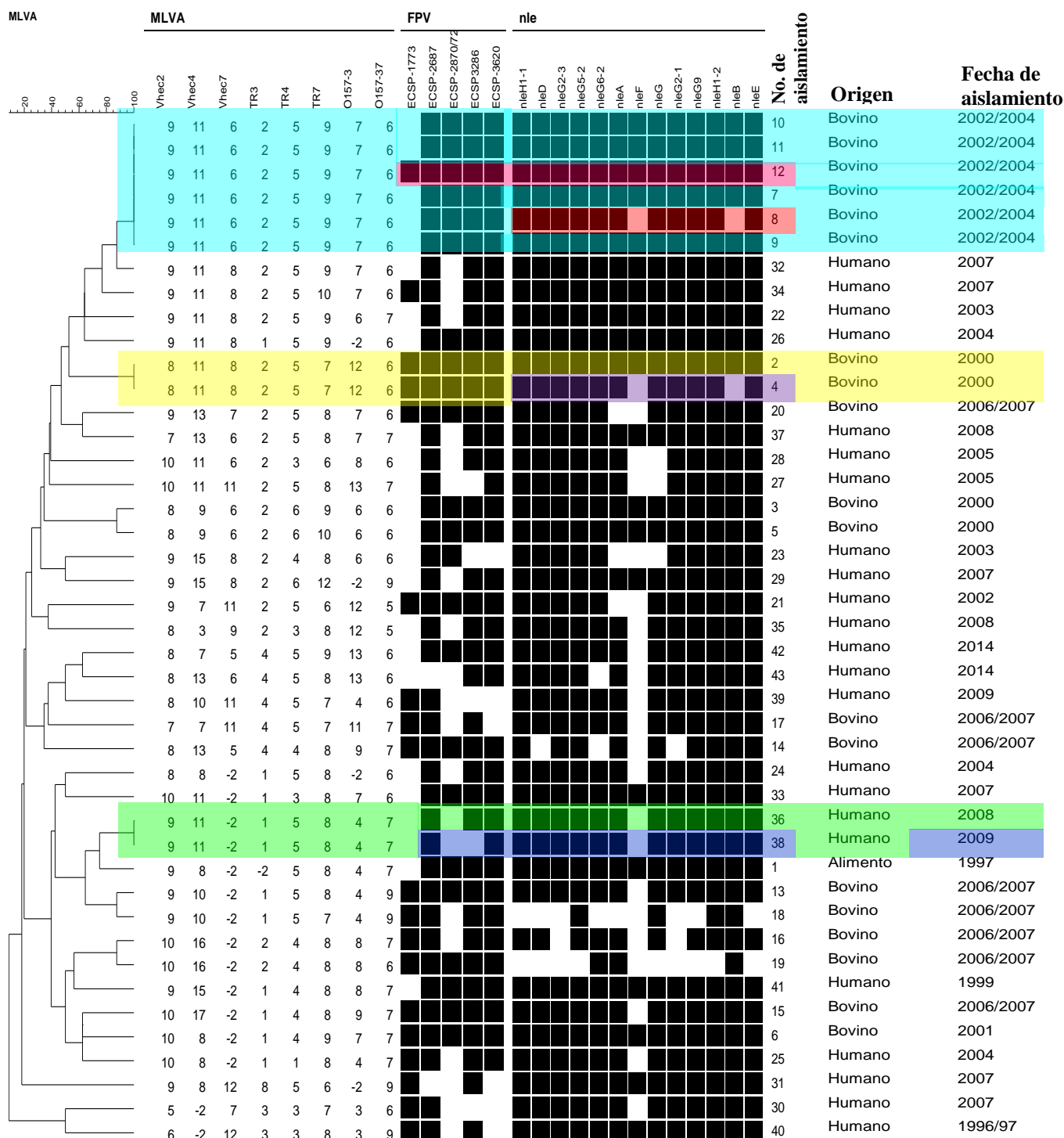


Tabla 32. Distribución y asociación de factores de virulencia entre los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados de origen humano según hayan o no causado SUH.

		No. (%) de aislamientos de origen humano			Análisis de asociación entre la presencia del gen y aislamientos de origen humano que provocaron SUH	
		Total (n=23)	SUH (n=13)	no-SUH (n=10)	OR ^a (95% CI)	P
Genes codificantes de FPV	ECSP-1773	6 (26)	3 (23)	3 (30)	0,7	>0,05
	ECSP-2687	21 (93)	11 (85)	10 (100)	0	>0,05
	ECSP-2870	6 (26)	3 (23)	3 (30)	0,7	>0,05
	ECSP3286	18 (78)	11 (85)	7 (70)	2,35	>0,05
	ECSP-3620	18 (78)	11 (85)	7 (70)	2,35	>0,05
Genes <i>nle</i>	OI-57 <i>nleG6-2</i>	22 (96)	12 (92)	10 (100)	0	>0,05
	<i>nleA</i>	21 (93)	12 (92)	9 (90)	1,33	>0,05
	OI-71 <i>nleF</i>	10 (43,5)	6 (46)	4 (40)	1,28	>0,05
	<i>nleG</i>	20 (87)	11 (85)	9 (90)	0,61	>0,05

^a*Odds ratios*: indica si es más (>1) o menos (<1) probable que un gen se encuentre asociado con aislamientos que provocaron SUH en comparación con aislamientos clínicos que no provocaron SUH.

CAPÍTULO III: DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

3.1 Discusión

Los desafíos emergentes en salud pública a nivel mundial en relación a VTEC incluyen la ocurrencia cada vez más frecuente y grave, de SUH, junto al incremento de factores de riesgo asociados con cambios en el patógeno, la población y el medio ambiente, que suceden a menudo de manera interconectada. Muchos estudios microbiológicos y epidemiológicos han confirmado el vínculo directo entre *E. coli* O157:H7 patógeno derivado del ganado y las infecciones humanas. La industria cárnica y los organismos reguladores han hecho grandes esfuerzos para evitar la entrada de este patógeno en la cadena de alimentos. Sin embargo, el control de *E. coli* O157:H7 en la cría de ganado y la posterior gestión de la seguridad alimentaria es un tema complicado debido a la presencia (transitoria) en el ganado asintomático. Además del consumo de carne mal cocida, otros factores de riesgo de la población incluyen el consumo de productos frescos, el contacto con ambientes contaminados con VTEC, la demografía, el estado socioeconómico y la inmunidad del huésped. Los riesgos del aumento de la contaminación ambiental por VTEC se encuentran relacionados con la intensificación de la agricultura y la ganadería (Karmali, 2017). Dada la alta tasa de SUH en Argentina, la carencia de un tratamiento específico, y la alta morbilidad, la prevención de las infecciones por VTEC es fundamental para disminuir su impacto sanitario (Rivas *et al.*, 2006).

El conocimiento sobre la estructura poblacional y la identificación de las características de virulencia presentes en cepas patógenas son útiles para la identificación rápida y la adopción de medidas preventivas de salud pública. La capacidad de distinguir con precisión entre cepas patógenas es crucial para un análisis epidemiológico y de vigilancia eficiente. Existen múltiples métodos de tipificación molecular que pueden identificar aislamientos en todo el mundo (epidemiología global) y/o en brotes de enfermedades localizadas (epidemiología local) (Foley *et al.*, 2009). Con el objetivo de prevenir, vigilar y controlar brotes localizados, la epidemiología local o a corto plazo, permite identificar la relación clonal, el origen de un brote y las vías de transmisión de un patógeno; mientras que la epidemiología global o a largo plazo, se aboca al estudio de la dinámica de la estructura poblacional (Fernandez Cuenca *et al.*, 2013).

El serotipo O157:H7 constituye un grupo genéticamente dinámico por pérdida o ganancia de elementos genéticos móviles, como fagos, islas de patogenicidad o plásmidos, lo cual contribuye a promover el cambio genético subyacente a la diversificación ecológica de este patógeno (Wick *et al.*, 2005). Se ha observado una variabilidad sustancial en cuanto a la presentación clínica de pacientes con infecciones por O157:H7. Esta variación también se ha observado entre los diferentes brotes ocurridos, presentando algunos de ellos frecuencias

notablemente altas de SUH y hospitalización en relación con otros (Manning *et al.*, 2008). Kim y colaboradores (1999) analizaron filogenéticamente el serotipo VTEC O157:H7, observando que las cepas divergían en dos linajes distintos. Los autores detectaron que los aislamientos de origen humano y bovino se distribuían de manera no aleatoria entre los linajes, sugiriendo que uno de estos linajes puede ser menos virulento para los humanos o puede no transmitirse de manera eficiente al hombre. Se ha reconocido que el ganado es un importante reservorio de múltiples subtipos genéticos de VTEC O157:H7 y no todos ellos se asocian con enfermedad en humanos (Bono *et al.*, 2007).

Otro de los métodos utilizados en epidemiología global es la tipificación de secuencias de múltiples *loci* (MLST), en el cual se comparan las secuencias de múltiples genes *housekeeping* en base a cambios en los nucleótidos (Maiden *et al.*, 1998; Spratt, 1999). En un estudio previo realizado por nuestro grupo, 2 de los aislamientos O157:H7, el N° 3 proveniente de un bovino de *feedlot* y el N° 40, obtenido de un paciente con SUH, fueron analizados por MLST y ambos fueron asignados al secuenciotipo ST 66, grupo clonal CG 11. Dentro de este grupo clonal también se ubican aislamientos provenientes de casos clínicos de EE.UU. y Alemania registrados en la base de datos EcMLST (Cadona *et al.*, 2016). Es decir, que aunque mediante MLST sólo fueron estudiados previamente un representante nativo de cada origen, se estima que filogenéticamente, y en base a estos marcadores, la población nativa es homogénea.

En la presente tesis, con el propósito de estudiar la estructura poblacional y la diversidad genética de aislamientos O157:H7 que circulan en la región pampeana de Argentina, se utilizó una combinación de métodos de subtipificación molecular, tales como polimorfismos específicos de linaje (LSPA6), polimorfismos de nucleótido simple (SNP), análisis de múltiples *loci* VNTR (MLVA) y determinación de grupos filogenéticos; junto al análisis de perfiles de virulencia (genes codificantes de factores putativos de virulencia -FPV-, genes codificados en plásmidos e islas de patogenicidad y genes codificantes de adhesinas) y de la actividad citotóxica en células Vero. La caracterización genética se realizó en 43 aislamientos VTEC O157:H7, obtenidos principalmente de ganado y de humanos, durante 18 años en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, FCV-UNCPBA. Estudios recientes postularon que en Argentina había una alta proporción de cepas hipervirulentas y recomendaron nuevos estudios con el fin de proporcionar mayor cantidad de datos sobre las cepas circulantes en el país (Mellor *et al.*, 2012; González *et al.*; 2013; 2015; Amigo *et al.*, 2015; Pianciola *et al.*, 2016).

En el presente estudio se determinó que las subpoblaciones VTEC O157:H7 de bovinos y de humanos de la región pampeana de Argentina no se diferencian desde el punto de vista del linaje. Muchos autores han asociado el linaje I/II con cepas O157:H7 hipervirulentas. Nuestros

resultados mostraron que este linaje es prevalente tanto en aislamientos de humanos como de bovinos y alimentos, razón por la cual todos representarían un potencial riesgo para la salud pública. Estos resultados son consistentes con los encontrados por otros autores (Hartzell *et al.*, 2011; Laing *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009) los cuales detectaron, en otras partes del mundo, que todas las cepas O157:H7 eran LSPA6 211111 (linaje I/II). En el presente estudio, sólo una cepa perteneció al linaje II, muy frecuentemente detectado en Holanda (Franz *et al.*, 2012).

Todos los aislamientos O157:H7 estudiados se clasificaron como clado 8. Se ha postulado que los aislamientos VTEC O157:H7 que pertenecen al clado 8 son más virulentos que los pertenecientes a otros clados (Manning *et al.*, 2008). Previamente, Mellor y colaboradores (2012) encontraron prevalencia del 80% y 50%, en aislamientos humanos y de ganado, respectivamente. Pianciola y colaboradores (2014) detectaron que el 92% de los aislamientos humanos de la provincia de Neuquén pertenecieron a dicho clado, y más tarde, estos autores (Pianciola *et al.*, 2016), extendieron el muestreo a otras provincias, encontrando 88 % y 59 % de prevalencias de cepas clado 8, entre aislamientos clínicos y bovinos. Por su parte, Amigo y colaboradores (2015), quienes analizaron dos aislamientos humanos y ocho de ganado de la región pampeana, detectaron ese clado en el 100 % y 50 % respectivamente; y Galli y colaboradores (2016), analizando aislamientos obtenidos de carne y carnicerías, detectaron 70 % de clado 8 y 30 % de clado 6. Nuestro resultado es el porcentaje más alto reportado en Argentina, aunque debe tenerse en cuenta que las cepas estudiadas en esta tesis no fueron evaluadas por el conjunto de 96 *loci* SNP propuestos por Manning y colaboradores (2008), sino por un método alternativo propuesto más tarde por Franz y colaboradores (2012). Este método, que permite detectar cepas pertenecientes al clado 8, fue validado por nosotros utilizando dos cepas control asignadas a clado 8 mediante el análisis de 96 SNP (Anguil 9.1 y VAC 07-2) y una cepa control perteneciente al clado 3 (EDL 933) (Cap. II, 2.2).

El 92 % de los aislamientos analizados para la identificación de polimorfismos A/T en el gen *tir*, presentó el alelo T. No se halló una asociación significativa entre el origen de los aislamientos y la presencia del alelo *tir* 255 T>A T (OR=1,55 – $P>0,05$), lo cual permite inferir la circulación casi exclusiva en la región de cepas asociadas a enfermedad en humanos entre los bovinos. Por otra parte, Laing y colaboradores (2009) observaron asociación entre el alelo *tir* 255 T>A T y cepas del linaje I/II, lo que queda confirmado por nuestros datos.

En relación a la asignación de grupos filogenéticos, el 95,4 % de los aislamientos O157:H7 estudiados perteneció al grupo E. En estudios anteriores, también la mayoría de las cepas VTEC O157:H7 de diferentes regiones geográficas fueron asignadas a este filogrupo (Clermont *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2008; Tenaillon *et al.*, 2010; Clermont *et al.*, 2011). Es

posible que en la bibliografía, la presencia del filogrupo E se encuentre subestimada, ya que en todos los trabajos previos a Clermont y colaboradores (2013) solo se definían 4 grupos (A, B1, B2 y D). En base a la PCR cuádruple propuesta en el trabajo citado, todas aquellas cepas clasificadas como grupo D probablemente puedan re-clasificarse como grupo E, tal como proponen Clermont y colaboradores (2013). Lo mismo ocurriría con cepas previamente caracterizadas como del grupo A, que podrían pertenecer en realidad al grupo C. La cepa control O157:H7 EDL 933, pertenece al filogrupo E (Tenaillon *et al.*, 2010; Clermont *et al.*, 2013). Las cepas pertenecientes a los filogrupos B2 y D son las que portan mayor cantidad de factores de virulencia y el grupo E es un subgrupo que se desprende del filogrupo D.

Previamente, Etoh y colaboradores (2014) estudiando un amplio conjunto de cepas VTEC O157:H7, observaron que aquellas cepas asignadas al linaje I/II y pertenecientes al clado 8 fueron asociadas a una mayor producción de Vtx, en relación a cepas pertenecientes a otros linajes. Nuestros resultados muestran la circulación casi exclusiva de aislamientos VTEC O157:H7, pertenecientes al linaje I/II, al clado hipervirulento 8, que portan el alelo *tir* 255 T>A T, al filogrupo E y que presentan efecto citotóxico, tanto en cepas de origen humano como bovino; razón por la cual todos los aislamientos de origen bovino representarían un potencial riesgo para la salud pública. La presencia en el ganado bovino de cepas O157:H7 con características similares a las cepas que causan enfermedades en humanos podría contribuir a explicar la alta incidencia de SUH en Argentina (Torres *et al.*, 2018).

En relación a técnicas útiles para resolver problemas de epidemiología local, si bien la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) ha sido propuesta como la técnica *gold-standard* para la subtipificación de patógenos transmitidos por los alimentos, particularmente para VTEC O157:H7, no siempre este método ha mostrado una capacidad de discriminación óptima para algunos aislamientos estrechamente relacionados (Hyytia Trees *et al.*, 2006). A diferencia del PFGE, las secuencias *target* de MLVA son específicas y los resultados más fáciles de analizar. La variación generada en los *loci* VNTR proporciona un alto nivel de discriminación, permitiéndole al MLVA, en muchos casos, tener un poder de discriminación igual o superior al PFGE. Por estos motivos, puede considerarse como un método muy útil para la subtipificación de cepas O157:H7 (Bustamante y Sanso, 2018; Namakura *et al.*, 2018).

Durante el último gran brote de SUH en EE.UU. producido por el consumo de espinacas frescas, la técnica de MLVA resultó clave para discernir los casos relacionados con el brote y la asociación del mismo al consumo de espinacas. Durante la investigación del mismo, se analizaron 176 aislamientos VTEC O157:H7 provenientes de pacientes y 12 de muestras de espinaca, resultando todos ellos con idéntico perfil MLVA (Sharapov *et al.*, 2016). En 2014 en

Inglaterra, también a través de esta técnica pudo identificarse un brote de O157:H7, asociado al consumo de alimentos frescos (RTE) (Sinclair *et al.*, 2016).

En la presente tesis se encontró una amplia diversidad genética mediante MLVA. Se observó un total de 36 perfiles MLVA, 33 de los cuales fueron únicos. El índice de diversidad de Simpson fue D_s : 0,98, lo cual confirma el alto poder de discriminación del método para este patógeno. Por otro lado, los perfiles de virulencia permitieron, en algunos casos, discriminar aislamientos que compartieron perfil MLVA, dando cuenta de la importancia del análisis de múltiples marcadores moleculares.

En cuanto a la diversidad genética detectada estudiando diferentes factores de virulencia, se encontró una alta prevalencia de genes que codifican FPV, particularmente ECSP_0242 (codifica un factor de virulencia putativo común en eucariotas que facilita interacciones proteína-proteína) y ECSP_2687 (codifica una proteína implicada en la disminución de la respuesta inmune del huésped), lo cual coincide con datos previos (Pianciola *et al.*, 2014). En el presente estudio, otros FPV como ECSP_1773 (codifica una proteína que reduce la expresión de citoquinas) y ECSP_2870/2872 (gen relacionado a la regulación adaptativa a las células hospedadoras vegetales) se asociaron de manera significativa con las cepas de ganado. En relación con este último gen putativo, Pianciola y colaboradores (2016) no encontraron asociación significativa entre éste y el origen de sus muestras.

Los genes *nle* se presentaron en distintas combinaciones en la totalidad de los aislamientos estudiados (n=43). Estos genes son determinantes genéticos de una variedad de funciones que permiten al patógeno colonizar y persistir en el ganado y causar enfermedad en humanos. Las proteínas efectoras codificadas por genes *nle* se inyectan en el citoplasma de la célula huésped mediante el SST3. Se trata de complejos multiproteicos comunes a muchos patógenos que permiten a las bacterias subvertir la biología de las células eucarióticas (Tobe *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la OI-122 fue la isla de patogenicidad completa más prevalente, la cual incluye genes con un papel demostrable en la virulencia, como *nleB*, *nleE* y *ent/esp L2* y *nleA* (Wu *et al.*, 2010). El gen *nleB* codifica un determinante de virulencia con un papel central en la enfermedad. Wickham y colaboradores (2007) informaron que este gen disminuye la dosis infectiva de *Citrobacter rodentium* (estudiado en modelo murino) requerida para la colonización y producir enfermedad. Por otro lado, Coombes y colaboradores (2008) asociaron la presencia de *nleF* y *nleHI-2*, detectados en esta tesis en una alta prevalencia (98 %), con el potencial de producir enfermedad grave en humanos.

El plásmido pO157 ha sido postulado como uno de los 3 factores más importantes implicados en la virulencia de VTEC O157:H7, junto con las Vtx y el LEE, codificando

proteínas tales como la enterohemolisina (EhxA), una serina proteasa (EspP), una catalasa–peroxidasa (KatP) y una zinc-metaloproteasa (StcE) que cliva un inhibidor que regula múltiples cascadas proteolíticas relacionadas con el proceso inflamatorio (Lim *et al.*, 2010). Detectamos un único perfil plasmídico en relación a los genes estudiados, *ehxA-espP-katP-stcE*, confirmando resultados previos que dan cuenta de la similitud de este plásmido entre cepas (Johnson y Nolan, 2009). Además de ser todas las cepas estudiadas *vtx2/eae*-positivas, todas presentaron los genes de adherencia al intestino *ehaA-elfA-ihA-lpfA1-3-lpfA2-2*.

Como complemento al análisis de genes de virulencia, se evaluó la citotoxicidad del sobrenadante de cultivos bacterianos de los aislamientos O157:H7 estudiados. Se encontró que todos los aislamientos VTEC O157:H7, excepto el perteneciente al linaje II, mostraron efecto citotóxico.

Entre las cepas de la región pampeana de Argentina, la mayoría de los marcadores genéticos presentan una frecuencia relativa similar entre los aislamientos clínicos y los de bovinos (con la excepción de los genes ECSP_1773 y ECSP_2870/2872). La aparición de genotipos predominantes, a veces exclusivos de regiones geográficas o países, sugiere que los aislamientos pueden haber respondido a la presión selectiva regional para formar poblaciones evolutivamente divergentes, aunque también es posible que la divergencia geográfica sea un producto de la deriva genética o del efecto fundador (Mellor *et al.*, 2015). La pertenencia de los aislamientos de la región pampeana de Argentina al clado hipervirulento 8 y al linaje I/II, la alta prevalencia de genes de factores de virulencia putativos y sus efectos citotóxicos exhibidos, permitiría asignar a la mayoría de las cepas O157:H7 de esta región, y de acuerdo con estudios previos, un alto riesgo para la salud pública y explican en parte, por qué Argentina es el país con la incidencia más alta de SUH en el mundo. En contraste con los resultados del presente estudio y con los encontrados previamente en Argentina, Franz *et al.* (2012), Yokoyama *et al.* (2012) y Söderlund *et al.* (2014), encontraron una alta diversidad genética (linajes/clados) entre cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas en Holanda (de ganado, humanos y comida), de Japón (de humanos) y de Suecia (de humanos y ganado), respectivamente.

Un trabajo recientemente publicado sugiere que las variaciones genómicas de *E. coli* O157:H7 podrían atribuirse principalmente a la dinámica de ciertos fagos (Gao *et al.*, 2018). Estos autores encontraron en una sola población de ganado diferentes SNP relacionados con la secuencia del bacteriófago integrado, que se ha propuesto juega un papel importante en el surgimiento de la *E. coli* O157:H7 y su virulencia. Futuros estudios en relación a las secuencias genómicas de los bacteriófagos presentes en las cepas nativas podrán confirmar o no esta hipótesis.

En relación con la hipótesis propuesta, podemos afirmar que las cepas VTEC O157:H7 que circulan en la región pampeana de Argentina son hipervirulentas. Según nuestros resultados, las cepas VTEC O157:H7 que circulan en esta región de Argentina son un grupo homogéneo en relación con los clados y la asignación de linaje, pero sin embargo muestran diversidad en relación a los perfiles MLVA, los genes que codifican FPV y los genes *nle*.

3.2 Conclusiones

- Las cepas VTEC O157:H7 de Argentina son un grupo filogenéticamente homogéneo que presenta diversidad genética en relación a sus perfiles MLVA, perfiles de genes codificantes de factores putativos de virulencia y perfiles de genes *nle*.
- El grupo de aislamientos clínicos O157:H7 y el de bovinos presentan igual frecuencia relativa de los marcadores genéticos estudiados, es decir, no se diferencian en su constitución genómica y, por lo tanto, no constituyen subpoblaciones divergentes.
- La pertenencia de los aislamientos al clado hipervirulento 8, al linaje I/II, la presencia del SNP (255) T>A en el gen *tir* y la alta prevalencia de genes codificantes de factores de virulencia, permite asignarle a las cepas O157:H7 que circulan entre los bovinos (y alimentos) de la región pampeana un alto riesgo para la salud pública.

Referencias Bibliográficas

- Abu-ali, G. S., Ouellette, L. M., Henderson, S. T., Lacher, D. W., Riordan, J. T., Whittam, T. S., Manning, S. D. (2010) 'Increased Adherence and Expression of Virulence Genes in a Lineage of *Escherichia coli* O157:H7 Commonly Associated with Human Infections', *PLoS One*, 5(4), pp. 1–10.
- Amigo, N., Mercado, E., Bentancor, A., Singh, P., Vilte, D., Larzábal, M., Cataldi, A. (2015) 'Clade 8 and Clade 6 Strains of *Escherichia coli* O157:H7 from Cattle in Argentina have hypervirulent-like phenotypes', *PLoS One*, 10(6), e0127710.
- Belardo, M. B. (2014) 'Conocimiento científico y problemas de salud. Una enfermedad emergente en Argentina, el Síndrome Urémico Hemolítico', *Revista de Saúde Colectiva*, 24(1), pp. 209–228.
- Bell, B. P., Goldoft, M., Griffin, P. M., Davis, M. A., Gordon, D. C., Tarr, P. I., Bartleson, C. A., Lewis, J. H., Barrett, T. J., Wells, J. G., Baron, R., Kobayashi, J. (1994) 'A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-Associated Bloody Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome From Hamburgers: The Washington Experience', *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 272(17), pp. 1349–1353.
- Bettelheim, K. A. (2007) 'The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*: Under-Rated Pathogens', *Critical Reviews in Microbiology*, 33, pp. 67–87.
- Blanco, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Rio, M., Prado, C., Fernández, L., Alonso, M. P., Rodríguez, A. (1996) '*Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC): un importante patógeno emergente responsable de intoxicaciones alimentarias', *Alimentaria*, 275, pp. 93-98.
- Blaser, M. J. (2011) 'Deconstructing a Lethal Foodborne Epidemic', *New England Journal of Medicine*, 365, pp. 1835-1836.
- Bono, J. L. (2009) 'Genotyping *Escherichia coli* O157:H7 for Its Ability to Cause Disease in Humans', *Current Protocols in Microbiology*, 5(5), pp. 1–10.
- Bono, J. L., Keen, J. E., Clawson, M. L., Durso, L. M., Heaton, M. P., Laegreid, W. W. (2007) 'Association of *Escherichia coli* O157:H7 *tir* polymorphisms with human infection', *BMC Infectious Diseases*, 7, pp. 98.

Bono, J. L., Smith, T. P. L., Keen, J. E., Harhay, G. P., McDanel, T. G., Mandrell, R. E., Jung, W. K., Besser, T. E., Gerner-Smidt, P., Bielaszewska, M., Karch, H., Clawson, M. L. (2012) 'Phylogeny of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from cattle and clinically ill humans', *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), pp. 2047–2062.

Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. (1996) 'KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7', *Microbiology*, 142(11), pp. 3305–3315.

Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H. (1997) 'EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V', *Molecular Microbiology*, 24(4), pp. 767–778.

Bugarel, M., Beutin, L., Fach, P. (2010) 'Low-density macroarray targeting non-locus of enterocyte effacement effectors (nle genes) and major virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): A new approach for molecular risk assessment of STEC isolates', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), pp. 203–211.

Burland, V., Shao, Y., Perna, N. T., Plunkett, G., Sofia, H. J., Blattner, F. R. (1998) 'The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7', *Nucleic Acids Research*, 26(18), pp. 4196–4204.

Bustamante, A. V., Lucchesi, P. M. A., Parma, A. E. (2009) Molecular characterization of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from Argentina by multiple-loci VNTR analysis (MLVA), *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, pp. 927–932.

Bustamante, A. V., Sanso, A. M., Lucchesi, P. M. A., Parma, A. E. (2011) 'Multiplex PCR Assay for the Detection of Five Putative Virulence Genes Encoded in Verotoxigenic *Escherichia coli* Plasmids', *Current Microbiology*, 62, pp. 1411–1415.

Bustamante, A. V., Sanso, A. M., Segura, D. O., Parma, A. E., Lucchesi, P. M. A. (2013) 'Dynamic of Mutational Events in Variable Number Tandem Repeats of *Escherichia coli* O157:H7', *BioMed Research International*, 2013, pp. 1-10.

Bustamante, A. V. y Sanso, A. M. (2018). Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis (MLVA) as subtyping technique for foodborne pathogens. En: Grumezescu AM & Holban AM (Eds.). *Handbook of Food Bioengineering: Microbial*

Contamination and Food Degradation, pp. 421-442.

Cadona, J. S., Bustamante, A. V., González, J., Sanso, A. M. (2016) 'Genetic Relatedness and Novel Sequence Types of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated in Argentina', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(93), pp. 1-7.

Cadona, J. S., Bustamante, A. V., González, J., Mariel Sanso, A. (2018) 'Erratum: Pathogenicity Islands distribution in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) (Genes, (2018) 9, 81, 10.3390/genes9020081)', *Genes*, 9(4), p. 9040222.

Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E. (2005) 'Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission', *Veterinary Research*, 36, pp. 289-311.

Carlos, C., Pires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., Gomez, T. A. T., Amaral, L. A., Ottoboni, L. M. M. (2010) '*Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source fecal contamination', *BMC Microbiology*, 10(161), pp. 1-10.

Cerda, J., Vera, C., Rada, G. (2013) 'Odds Ratio: aspectos teóricos y prácticos', *Revista Médica de Chile*, 141, pp. 1329-1335.

Clawson, M. L., Keen, J. E., Smith, T. P. L., Durso, L. M., Mcdaneld, T. G., Mandrell, R. E., Davis, M. A., Bono, J. L. (2009) 'Phylogenetic classification of *Escherichia coli* O157:H7 strains of human and bovine origin using a novel set of nucleotide polymorphisms', *Genome Biology*, 10(5), R56, pp. 1-12.

Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Bonacorsi, P. (2000) 'Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group', *Applied and environmental microbiology*, 66(10), pp. 4555-4558.

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., Gordon, D. M. (2013) 'The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups', *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), pp. 58-65.

Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., Glodt, J., Picard, B., Oswald, E., Denamur, E. (2011) 'Animal and human pathogenic *Escherichia coli*

strains share common genetic backgrounds’, *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), pp. 654–662.

Cobeñas, C. J., Alconcher, L. F., Spizzirri, A. P., Rahman, R. C. (2007) ‘Long-term follow-up of Argentinean patients with hemolytic uremic syndrome who had not undergone dialysis’, *Pediatric Nephrology*, 22, pp. 1343–1347.

Coombes, B. K., Wickham, M. E., Mascarenhas, M., Gruenheid, S., Finlay, B. B., Karmali, M. A. (2008) ‘Molecular analysis as an aid to assess the public health risk of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains’, *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), pp. 2153–2160.

Curran, K. G., Heiman Marshall, K. E., Singh, T., Doobovsky, Z., Hensley, J., Melius, B., Whitlock, L., Stevenson, L., Leinbach, J., Oltean, H., Glover, W. A., Kunesh, T., Lindquist, S., Williams, I., Nichols, M. (2017). ‘An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections following a dairy education school field trip in Washington state’, 2015. *Epidemiology & Infection*, 146(4), pp. 442-449.

Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J. A., O’Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T., Finlay, B. B. (2004) ‘Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), pp. 3597–3602.

van Diemen, P. M., Dziva, F., Stevens, M. P., Wallis, T. S. (2005) ‘Identification of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H- Genes Required for Intestinal Colonization in Calves’, *Infection and Immunity*, 73(3), pp. 1735–1743.

Dziva, F., van Diemen, P. M., Stevens, M. P., Smith, A. J., Wallis, T. S. (2004) ‘Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis’, *Microbiology*, 150(11), pp. 3631–3645.

Dziva, F., Mahajan, A., Cameron, P., Currie, C., McKendrick, I. J., Wallis, T. S., Smith, D. G. E., Stevens, M. P. (2007) ‘EspP, a Type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells’, *FEMS Microbiology Letters*, 271(2), pp. 258–264.

Etoh, Y., Hirai, S., Ichihara, S., Maeda, E., Yokoyama, E., Sera, N., Horikawa, K., Yamamoto, T. (2014) 'Evolutionary model of the divergence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 lineage I/II clades reconstructed from high resolution melting and Shiga-like toxin 2 analyses', *Infection, Genetics and Evolution*, 24, pp. 140-145.

Fernandez Cuenca, F., López Cerero, L., Pascual Hernández, A. (2013) 'Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(1), pp. 20-25.

Fernández, D., Krüger, A., Polifroni, R., Bustamante, A. V, Sanso, A. M., Etcheverría, A. I., Lucchesi, P. M. A., Parma, A. E., Padola, N. L., Schroeder, G. N. (2013) 'Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O130:H11 and O178:H19 isolated from dairy cows', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3(9), pp. 1–6.

Fernández, D., Rodriguez, E., Arroyo, G.H., Padola, N.L., Parma, E.A. (2009) 'Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (*stx*) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina', *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), pp. 1260-1267.

Fernández, D., Sanz, M. E., Parma, A. E., Padola, N. L. (2012) 'Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from newborn, weaning and rearing dairy calves', *Jornal of Dairy Science*, 95(9), pp. 5340-5343.

Ferraris, J. R., Ramirez, J. A., Ruiz, S., Caletti, M. G., Vallejo, G., Piantanida, J. J., Araujo, J. L., Sojo, E. T. (2002) 'Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Absence of recurrence after renal transplantation', *Pediatric Nephrology*, 17(10), pp. 809–814.

Foley, S. L., Lynne, A. M. y Nayak, R. (2009) 'Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens', *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), pp. 430–440.

Franz, E., van Hoek, A. H., van der Wal F. J., de Boer, A., Zwartkruis-Nahuis, A., van der Zwaluw, K., Aarts H. J., Heuvelink, A. E. (2012) 'Genetic Features Differentiating Bovine, Food, and Human Isolates of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 in The Netherlands', *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), pp. 772–780.

Franz, E., van Hoek, A.H., Wuite, M., van der Wal, F.J., de Boer, A. G., Bouw, E. I., Aarts, H. J. (2015) 'Molecular hazard identification of non-O157 Shiga toxin-producing

Escherichia coli (STEC)', *PLoS One*, 10(3), pp. 1–21.

Furukawa, I., Suzuki, M., Masaoka, T., Nakajima, N., Mitani, E., Tasaka, M., Teranishi, H., Matsumoto, Y., Koizumi, M., Ogawa, A., Oota, Y., Homma, S., Sasaki, K., Satoh, H., Sato, K., Muto, S., Anan, Y., Kuroki, T. (2018) 'Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Infection Associated with Minced Meat Cutlets Consumption in Kanagawa, Japan' *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 71(6), pp. 436-441.

Galli, L., Brusa, V., Singh, P., Cataldi, A. A., Manning, S., Peral-García, P., Leotta, G.A. (2016) 'High prevalence of clade 8 *Escherichia coli* O157:H7 isolated from retail meat and butcher shop environment', *Infection, Genetics and Evolution*, 45, pp.1-5.

Gao, X., Yang, X., Noll, L., Shi, X., Worley, J., Allard, M., Brown, E., Nagaraja, T. G., Meng J. (2018) 'Whole genome shotgun - sequencing revealed highly polymorphic genome regions and genes in *Escherichia coli* O157:H7 isolates collected from a single feedlot', *PLoS ONE*, 13(8), pp. 1-16.

Gianantonio, C. A., Vitacco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. E., Sojo, E. T. (1973) 'El síndrome hemolítico-urémico', *Nephron*, 11, pp. 174–192.

Gómez, D., Miliwebsky, E., Fernandez Pascua, C., Baschkier, A., Manfredi, E., Zotta, M., Nario, F., Paqin, A., Sanz, M., Etcheberria, A., Padola, N. L., Parma, A., Rivas, M. (2002) 'Isolation and characterization of Shiga-toxi-producing *Escherichia coli* from frozen hamburgers and soft cheeses', *Revista Argentina de Microbiología*, 34, pp. 66-71.

Gonzalez, J., Cadona, J., Sanso, A. M., Bustamante, A. V. (2015) 'Genotypic characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Argentina', 9th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) e producing *Escherichia coli* infections (VTEC2015). Abstracts: 175 Group B: 40-41.

González, J., Sanso, A. M., Bustamante, A. V. (2013) '*Escherichia coli* verotoxigenico O157:H7: caracterización mediante LSPA6 y perfil de virulencia plasmídico', XIII Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, *Revista Argentina de Microbiología*, 45, p. 73.

Gordon, D. M., Clermont, O., Tolley, H., Denamur, E. (2008) 'Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: Multi-locus sequence typing versus the PCR

triplex method', *Environmental Microbiology*, 10(10), pp. 2484–2496.

Grant, J., Wendelboe, A. M., Wendel, A., Jepson, B., Torres, P., Smelser, C., Rolfs, R. T. (2008) 'Spinach-associated *Escherichia coli* O157:H7 Outbreak, Utah and New Mexico, 2006', *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), pp. 1633–1636.

Grys, T. E., Walters, L. L., Welch, R. A. (2006) 'Characterization of the StcE protease activity of *Escherichia coli* O157:H7', *Journal of Bacteriology*, 188(13), pp. 4646–4653.

Guth, B. E. C., Prado, V., Rivas, M. (2010) 'Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*', En: Torres, A.G. (Editor). *Patogenic Escherichia coli in Latin America*. pp. 65-83.

Gyles, C. L. (2007) 'Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview', *Journal of Animal Science*, 85(13 Suppl), pp. 45-62.

Hartzell, A., Chen, C., Lewis, C., Liu, K., Reynolds, S., Dudley, E. (2011) 'Escherichia coli O157:H7 of genotype lineage-specific polymorphism assay 211111 and clade 8 are common clinical isolates within Pennsylvania', *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(7), pp. 763-768.

Hernandes, R. T., Velsko, I., Sampaio, S. C. F., Elias, W. P., Robins-Browne, R. M., Gomes, T. A. T., Girón, J. A. (2011) 'Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp. 8391–8399.

Herold, S., Paton, J. C., Paton, A. W. (2009) 'Sab, a novel autotransporter of *Locus* of Enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation', *Infection and Immunity*, 77, pp. 3234-3243.

Hunter, P. R. y Gaston, M. A. (1988) 'Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity', *Journal of Clinical Microbiology*, 26, pp. 2465-2466.

Hyttiä-Trees, E., Smole, S. C., Fields, P. A., Swaminathan, B., Ribot, E. M. (2006) 'Second Generation Subtyping: A Proposed PulseNet Protocol for Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157)', *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(1), pp. 118–131.

Izumiya, H., Pei, Y., Terajima, J., Ohnishi, M., Hayashi, T., Iyoda, S., Watanabe, H. (2010) 'New system for multilocus variable-number tandem-repeat analysis of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains belonging to three major serogroups: O157, O26, and O111', *Microbiology and Immunology*, 54(10), pp. 569-577.

Johnson, T. J. y Nolan, L. K. (2009). 'Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73, pp. 750-774.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L. T. (2004) 'Pathogenic *Escherichia coli*', *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), pp. 123–140.

Karmali, M. A. (1989) 'Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*', *Clinical Microbiology Reviews*, 2(1), pp. 15-38.

Karmali, M. A. (2017) 'Emerging public health challenges of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* related to changes in the pathogen, the population, and the environment', *Clinical Infectious Diseases*, 64(3), pp. 371–376.

Karmali, M. A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B. (2003) 'Association of genomics O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease', *Journal of Clinical Microbiology*, 41, pp. 4930-4940.

Kauffmann, F. (1947) 'The serology of the *coli* group', *Journal of Immunology*, 57, pp. 71–100.

Keim, P., Price, L. B., Klevytska, A. M., Smith, K. L., Schupp, J. M., Okinaka, R., Jackson, P. J., Hugh Jones M. E. (2000) 'Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*', *Journal of Bacteriology*, 182, pp. 2928-2936.

Keys, C., Kemper, S., Keim, P. (2005) 'Highly diverse variable number tandem repeat loci in the *E. coli* O157:H7 and O55:H7 genomes for high-resolution molecular typing', *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), pp. 928–940.

Kim, J., Nietfeldt, J., Benson, A. K. (1999) 'Octamer-based genome scanning

distinguishes a unique subpopulation of *Escherichia coli* O157:H7 strains in cattle', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(23), pp. 13288-13293.

Kim, J., Nietfeldt, J., Ju, J., Wise, J., Fegan, N., Desmarchelier, P., Benson, A. K. (2001) 'Ancestral Divergence, Genome Diversification, and Phylogeographic Variation in Subpopulations of Sorbitol-Negative, beta Glucuronidase-Negative Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157', *Journal of Bacteriology*, 183(23), pp. 6885–6897.

Konczy, P., Ziebell, K., Mascarenhas, M., Choi, A., Michaud, C., Kropinski, A. M., Whittam, T. S., Wickham, M., Finlay, B., Karmali, M. A. (2008) 'Genomic O island 122, locus for enterocyte effacement, and the evolution of virulent verocytotoxin-producing *Escherichia coli*', *Journal of Bacteriology*, 190(17), pp. 5832–5840.

Konowalchuk, J., Speirs, J. I., Stavric, S. (1977) 'Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 18(3), pp. 775-779.

Kulasekara, B. R., Jacobs, M., Zhou, Y., Sims, E., Saenphimmachak, C., Rohmer, L., Ritchie, J. M., Radey, M., Mckevitt, M., Freeman, T. L., Haugen, E., Gillett, W., Fong, C., Beskhlebnaya, V., Waldor, M. K., Samadpour, M., Whittam, T. S., Kaul, R., Brittnacher, M., Miller, S. I. (2009) 'Analysis of the genome of the *Escherichia coli* O157:H7 spinach-associated outbreak isolate indicates candidate genes that may enhance virulence', *Infection and Immunity*, 77(9), pp. 3713-3721.

Laing, C. R., Buchanan, C., Taboada, E. N., Zhang, Y., Karmali, M. A., Thomas, J. E., Gannon, V. P. (2009) 'In silico genomic analyses reveal three distinct lineages of *Escherichia coli* O157:H7, one of which is associated with hyper-virulence', *BMC Genomics*, 10, p. 287.

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. (2007) 'Clustal W and Clustal X version 2.0', *Bioinformatics*, 23(21), pp. 2947–8.

Lathem, W. W., Grys, T. E., Witowski, S. E., Torres, A. G., Kaper, J. B., Tarr, P. I., Welch, R. A. (2002) 'StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor', *Molecular Microbiology*, 45, pp. 277-288.

Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., Wood, T. K. (2010) 'Identification of stress-

related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene', *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), pp. 2088-2102.

Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P. L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., Djossou, F., Dupont, C., Perroz, G., Picard, B., Catzeflis, F., Andreumont, A., Denamur, E. (2013) 'Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure', *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), pp. 49–57.

Leyton, D. L., Sloan, J., Hill, R. E., Doughty, S., Hartland, E. L. (2003) 'Transfer Region of pO113 from Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Similarity with R64 and Identification of a Novel Plasmid-Encoded autotransporter, EpeA', *Infection and Immunity*, 71(11), pp. 6307–6319.

Lim, J.Y., J. Yoon, C.J. Hovde. (2010) 'A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), pp. 5-14

Lindstedt, B. A. (2005) 'Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria', *Electrophoresis*, 26(13), pp. 2567–2582.

Lindstedt, B. A., Heir, E., Gjernes, E., Vardund, T., Kapperud, G. (2003) 'DNA fingerprinting of shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 based on multiple-locus variable-number tandem-repeats analysis (MLVA)', *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2, pp. 1–7.

Lindstedt, B. A., Thorstensen Brandal, L., Aas, L., Vardund, T., Kapperud, G. (2007) 'Study of polymorphic variable-number of tandem repeats *loci* in the ECOR collection and in a set of pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* isolates for use in a genotyping assay', *Journal of Microbiology Methods*, 69, pp. 197-205.

Lindstedt, B. A., Vardund, T., Kapperud, G. (2004) 'Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis of *Escherichia coli* O157 using PCR multiplexing and multi-colored capillary electrophoresis', *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), pp. 213–222.

Liu, K., Knabel, S. J., Dudley, E. G. (2009) '*rhs* genes are potential markers for multilocus sequence typing of *Escherichia coli* O157:H7 strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(18), pp. 5853–5862.

Luo, Y., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Creagh, A. L., Knoechel, D. G., Haynes, C. A., Finlay, B. B., Strynadka, N. C. (2000) 'Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex', *Nature*, 405(6790), pp. 1073-7.

Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. y Spratt, B. G. (1998) 'Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 95(6), pp. 3140–3145.

Majowicz, S. E., Scallan, E., Jones-Bitton, A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., Yeung, D. H., Kirk, M. D. (2014) 'Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis', *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), pp. 447-455.

Manning, S. D., Motiwala, A. S., Springman, A. C., Qi, W., Lacher, D. W., Ouellette, L. M., Mladonicky, J. M., Somsel, P., Rudrik, J. T., Dietrich, S. E., Zhang, W., Swaminathan, B., Alland, D., Whittam, T. S. (2008) 'Variation in virulence among clades of *Escherichia coli* O157: H7 associated with disease outbreaks', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 105(12), pp. 4868-4873.

Masana, M. O., Leotta, G. A., Del Castillo, L. L., D'Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Vilacoba, E., Carbonari, C., Rodriguez, H. R., Rivas, M. (2010) 'Prevalence, Characterization, and Genotypic Analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Selected Beef Exporting Abattoirs of Argentina', *Journal of Food Protection*, 73(4), pp. 649-656.

McDaniel, T. K., Jarvis, K. J., Donnenberg, M. S., Kaper, J. B. (1995) 'A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 92, pp. 1664–1668.

McDaniel, T. K. y Kaper, J. B. (1997) 'A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12', *Molecular Microbiology*, 23, pp. 399-407.

Mead, P. S. y Griffin, P. M. (1998) '*Escherichia coli* O157:H7', *The Lancet*, 352, pp. 1207–1212.

Mele, C., Remuzzi, G., Noris, M. (2014) 'Hemolytic uremic syndrome', *Seminars in Immunopathology*, 36(4), pp. 399-420.

Mellor, G. E., Fegan, N., Gobius, K. S., Smith, H. V., Jennison, A. V., D'Astek, B. A., Rivas, M., Shringi, S., Baker, K. N. K., Besser, T. E. (2015) 'Geographically distinct *Escherichia coli* O157 isolates differ by lineage, Shiga toxin genotype, and total Shiga toxin production', *Journal of Clinical Microbiology*, 53(2), pp. 579–586.

Mellor, G. E., Sim, E. M., Barlow, R. S., Astek, B. A. D., Galli, L., Chinen, I., Rivas, M., Gobius, K. S. (2012) 'Phylogenetically Related Argentinean and Australian *Escherichia coli* O157 Isolates Are Distinguished by Virulence Clades and Alternative Shiga Toxin 1 and 2 Prophages', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(13), pp. 4724–4731.

Mercado, E. C., Gioffré, A., Rodríguez, S. M., Cataldi, A., Irino, K., Elizondo, A. M., Cipolla, A. L., Romano, M. I., Malena, R., Méndez, M. A. (2004) 'Non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* isolated from diarrhoeic calves in Argentina', *Journal of Veterinary Medicine*, 51, pp. 82-88.

Michino, H., Araki, K., Minami, S., Takaya, S., Sakai, N., Miyazaki, M., Ono, A., Yanagawa, H. (1999) 'Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in school children in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts', *American Journal of Epidemiology*, 150(8), pp. 787–796.

Miko, A., Lindstedt, B. A., Brandal, L. T., Løbersli, I., Beutin, L. (2010) 'Evaluation of multiple-locus variable number of tandem-repeats analysis (MLVA) as a method for identification of clonal groups among enteropathogenic, enterohaemorrhagic and avirulent *Escherichia coli* O26 strains', *FEMS Microbiology Letters*, 303, pp. 137-146.

Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K. and the SNP workshop group (2004) 'SNPs in ecology, evolution and conservation', *Trends in Ecology & Evolution*, 19, pp. 208-216.

Nataro, J. P. y Kaper, J. B. (1998) 'Diarrheagenic *Escherichia coli*', *Clinical Microbiology Reviews*, 11, pp. 142-201.

Nakamura, H., Iguchi, A., Maehara, T., Fujiwara, K., Fujiwara, A., Ogasawara, J. (2018) 'Comparison of Three Molecular Subtyping Methods among O157 and Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Japanese Cattle', *Japanese Journal of Infectious*

Diseases, 71, pp. 45–50.

Neupane, M. A., Abu-Ali, G. S., Mitra, A., Lacher, D. W., Manning, S. D., Riordan, J. T. (2011) 'Shiga toxin 2 overexpression in *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with severe human disease', *Microbial Pathogenesis*, 51, pp. 466-470.

Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Antonio, G. F., Boxrud, D. J., Harrison, L. H., Pacheco, A. G. F. (2003) 'Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Distinguishes Outbreak and Sporadic *Escherichia coli* O157:H7 Isolates', *Journal of clinical microbiology*, 41(12), pp. 5389–5397.

Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Harrison, L. H. (2004) 'Genotyping *primers* for the fully automated multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Escherichia coli* O157:H7', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), p. 3908.

Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Shutt, K. A., Harrison, L. H. (2006) 'Locus-Specific Mutational Events in a Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of *Escherichia coli* O157:H7', *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp. 374-377.

Padola, N. L., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J., Etcheverria, I., Arroyo, G. H., Usera, M. A., Parma, A. E. (2004) 'Serotypes and virulence genes of bovine Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina', *Veterinary Microbiology*, 100, pp. 3–9.

Parma, A. E., Sanz, M. E., Blanco, J. E., Blanco, J., Vin, M. R., Blanco, M. (2000) 'Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina Importance in public health', *European Journal of Epidemiology*, 16, pp. 757–762.

Paton, A. W., Srimanote, P., Talbot, U. M., Wang, H., Paton, J. C. (2004) 'A New Family of Potent AB₅ Cytotoxins Produced by Shiga Toxigenic *Escherichia coli*', *The Journal of Experimental Medicine*, 200(1), pp. 35–46.

Paton, A. W., Srimanote, P., Woodrow, M. C., Paton, J. C. (2001) 'Characterization of Saa, a Novel Autoagglutinating Adhesin Produced by Locus of Enterocyte Effacement-Negative Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* Strains That Are Virulent for Humans', *Infection and Immunity*, 69(11), pp. 6999–7009.

Paton, J. C. y Paton, A. W. (1998) 'Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections', *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), pp. 450–479.

Pianciola, L., Chinen, I., Mazzeo, M., Miliwebsky, E., González, G., Müller, C., Carbonari, C., Navello, M., Zitta, E., Rivas, M. (2014) 'Genotypic characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains that cause diarrhea and hemolytic uremic syndrome in Neuquén, Argentina', *International Journal of Medical Microbiology*, 304, pp. 499-504.

Pianciola, L., D'Astek, B. A., Mazzeo, M., Chinen, I., Masana, M., Rivas, M. (2016) 'Genetic features of human and bovine *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in Argentina', *International Journal of Medical Microbiology*, 306(2), pp. 123–130.

Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., Swerdlow, D. L. (2005) 'Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002', *Emerging Infectious Diseases*, 11, pp. 603–609.

Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., Hargrett, N. T., Blake, P. A., Cohen, M. L. (1983) 'Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype', *The New England Journal of Medicine*, 308(12), pp. 681-685.

Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., Leotta, G. A. (2006) 'Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión', *Medicina*, 66(3), pp. 27–32.

Rivas, M., Padola, N. L., Lucchesi, P. M. A., Masana, M. (2010) 'Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina', En: Torres, A.G. (Editor). *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. pp. 142-161.

Rivas, M., Sosa-Estani, S., Rangel, J., Caletti, M. G., Vallés, P., Roldán, C. D., Balbi, L., Marsano de Mollar, M. C., Amoedo, D., Miliwebsky, E., Chinen, I., Hoekstra, R. M., Mead, P., Griffin, P. M. (2008) 'Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina', *Emerging infectious diseases*, 14(5), pp. 763–771.

Rivas, M., Chinen, I., Guth, B. E. C. (2016) 'Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*', En: Torres, A.G. (Editor). *Escherichia coli in the Americas*. pp. 97-123.

Rivero, M. A., Passucci, J. A., Rodriguez, E. M., Parma, A. E. (2010) 'Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina', *Journal of Medical Microbiology*, 59, pp. 345–352.

Samadder, P., Xicohtencatl-Cortes, J., Saldaña, Z., Jordan, D., Tarr, P. I., Kaper, J. B., Girón, J. A. (2009) 'The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxigenic *E. coli* O157:H7', *Environmental Microbiology*, 11(7), pp. 1815–1826.

Sanz, M. E., Viñas, M. R., Parma, A. E. (1998) 'Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina', *European Journal of Epidemiology*, 14, pp. 399–403.

Schmidt, H., Beutin, L., Karch, H. (1995) 'Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933', *Infection and Immunity*, 63(3), pp. 1055–1061.

Schmidt, H., Kernbach, C., Karch, H. (1996) 'Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7', *Microbiology*, 142(4), pp. 907–914.

Sharapov, U. M., Wendel, A. M., Davis, J. P., Keene, W. E., Farrar, J., Sodha, S., Hyatt-Trees, J. A., Leeper, M., Gerner-Smidt, P., Griffin, P. M., Branden, C., and the Outbreak Investigation Team, (2016) 'Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Associated with Consumption of Fresh Spinach: United States, 2006', *Journal of Food Protection*, 79(12), pp. 2024–2030.

Sinclair, C., Jenkins, C., Warburton, F., Adak, G. K., Harris, J. P. (2017) 'Investigation of a national outbreak of STEC *Escherichia coli* O157 using online consumer panel control methods: Great Britain, October 2014', *Epidemiology & Infection*, 145(5), pp. 864–871.

Söderlund, R., Jernberg, C., Ivarsson, S., Hedenström, I., Eriksson, E., Bongcam-rudloff, E., Aspán, A. (2014) 'Molecular Typing of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Swedish Cattle and Human Cases: Population Dynamics and Virulence', *Journal of Clinical Microbiology*, 52(11), pp. 3906–3912.

Sokurenko, E. V., Hasty, D. L., Dykhuizen, D. E. (1999) 'Pathoadaptative mutations:

gene loss and variation in bacterial pathogens', *Trends in Microbiology*, 7, pp. 191-195.

Sonntag, A. K., Prager, R., Bielaszewska, M., Zhang, W., Fruth, A., Tschäpe, H., Karch, H. (2004) 'Phenotypic and Genotypic Analyses of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145 Strains from Patients in Germany', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), pp. 954–962.

Spizzirri, F. D., Rahman, R. C., Bibiloni, N., Ruscasso, J. D., Amoreo, O. R. (1997) 'Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: Long-term follow-up and prognostic features', *Pediatric Nephrology*, 11(2), pp. 156–160.

Spratt, B. G. (1999) 'Multilocus sequence typing: Molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet', *Current Opinion in Microbiology*, 2(3), pp. 312–316.

Szalo, I. M., Goffaux, F., Pirson, V., Piérard, D., Ball, H., Mainil, J. (2002) 'Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes encoding for putative adhesins of human EHEC strains', *Research in Microbiology*, 153(10), pp. 653–658.

Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R., Besser, T. E. (2000) 'Iha: A novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure', *Infection and Immunity*, 68(3), pp. 1400–1407.

Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., Denamur, E. (2010) 'The population genetics of commensal *Escherichia coli*', *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), pp. 207–217.

Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T., Pallen, M. J. (2006) 'An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(40), pp. 14941–14946.

Todd, W. T. A. y Dundas, S. (2001) 'The management of VTEC O157 infection', *International Journal of Food Microbiology*, 66, pp. 103–110.

Torres, A., Amaral, M., Bentancor, L., Galli, L., Goldstein, J., Krüger, A., Rojas-

Lopez, M. (2018) 'Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America', *Microorganisms*, 6(4), pp. 1-20.

Torres, A. G., Blanco, M., Valenzuela, P., Slater, T. M., Patel, S. D., Dahbi, G., López, C., Barriga, X. F., Blanco, J. E., Gomes, T. A. T., Vidal, R., Blanco, J. (2009) 'Genes related to long polar fimbriae of pathogenic *Escherichia coli* strains as reliable markers to identify virulent isolates', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(8), pp. 2442–2451.

Torres, A. G., Giron, J. a, Perna, N. T., Blattner, F. R., Avelino-Flores, F., Kaper, B., Burland, V., Kaper, J. B. (2002) 'Identification and Characterization of lpfABCCDE, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*', *Infection and Immunity*, 70(10), pp. 5416–5427.

Torres, A. G., Kanack, K. J., Tutt, C. B., Popov, V., Kaper, J. B. (2004) 'Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains', *FEMS Microbiology Letters*, 238(2), pp. 333–344.

Torres, A. G., Slater, T. M., Patel, S. D., Popov, V. L., Arenas-Hernandez, M. M. (2008) 'Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells', *Infection and Immunity*, 76, pp. 5062-5071.

Vogler, A. J., Keys, C., Nemoto, Y., Colman, R. E., Jay, Z., Keim, P., (2006). 'Effect of repeat copy number on variable-number tandem repeat mutations in *Escherichia coli* O157:H7'. *Journal of Bacteriology*. 188(12), pp. 4253–4263.

Weissman, S. J., Moseley, S. L., Dykhuizen, D. E., Sokurenko, E. V. (2003) 'Enterobacterial adhesins and the case for studying SNPs in bacteria', *Trends in Microbiology*, 3, pp. 115-117.

Wells, T. J., Sherlock, O., Rivas, L., Mahajan, A., Beatson, S. A., Torpdahl, M., Webb, R. I., Allsopp, L. P., Gobius, K. S., Gally, D. L., Schembri, M. A. (2008) 'EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation', *Environmental Microbiology*, 10(3), pp. 589–604.

Whitworth, J., Zhang, Y., Bono, J., Pleydell, E., French, N., Besser, T. (2010) 'Diverse genetic markers concordantly identify bovine origin *Escherichia coli* O157 genotypes underrepresented in human disease', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), pp. 361-

Wick, L. M., Qi, W., Lacher, D. W., Whittam, T. S. and Ackerl, J. B. (2005) 'Evolution of Genomic Content in the Stepwise Emergence of *Escherichia coli* O157:H7', *Journal of Bacteriology*, 187(5), pp. 1783–1791.

Wickham, M. E., Lupp, C., Mascarenhas, M., Vazquez, A., Coombes, B. K., Brown, N. F., Coburn, B. a, Deng, W., Puente, J. L., Karmali, M. a and Finlay, B. B. (2006) 'Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection', *The Journal of infectious diseases*, 194(6), pp. 819–827.

Wickham, M. E., Lupp, C., Vazquez, A., Mascarenhas, M., Coburn, B., Coombes, B. K., Karmali, M. A., Puente, J. L., Deng, W., Finlay, B. B. (2007) '*Citrobacter rodentium* virulence in mice associates with bacterial load and the type III effector NleE', *Microbes and Infection*, 9(3), pp. 400–407.

Wu, Y., Hinenoya, A., Taguchi, T., Nagita, A., Shima, K., Tsukamoto, T., Sugimoto, N., Asakura, M., Yamasaki, S. (2010) 'Distribution of virulence genes related to adhesins and toxins in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle and diarrheal patients in Japan.', *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72, pp. 589–597.

Xiong, Y., Wang, P., Lan, R., Ye, C., Wang, H., Ren, J., Jing, H., Wang, Y., Zhou, Z., Bai, X., Cui, Z., Luo, X., Zhao, A., Wang, Y., Zhang, S., Sun, H., Wang, L., Xu, J. (2012) 'A novel *Escherichia coli* O157:H7 clone causing a major hemolytic uremic syndrome outbreak in China', *PLoS One*, 7(4), pp. 1–10.

Yang, Z., Kovar, J., Kim, J., Nietfeldt, J., Smith, D. R., Moxley, R. a, Olson, M. E., Fey, D., Benson, A. K., Fey, P. D. (2004) 'Identification of Common Subpopulations of Non-Sorbitol-Fermenting, β -Glucuronidase-Negative *Escherichia coli* O157:H7 from Bovine Production Environments and Human Clinical Samples', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), pp. 6846–6854.

Yokoyama, E., Hirai, S., Hashimoto, R., Uchimura, M. (2012) 'Clade analysis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotype O157:H7/H- strains and hierarchy of their phylogenetic relationships', *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), pp. 1724–1728.

Zhang, W. L., Bielaszewska, M., Liesegang, A., Tschäpe, H., Schmidt, H., Bitzan,

M., Karch, H. (2000) 'Molecular characteristics and epidemiological significance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains', *Journal of Clinical Microbiology*, 38(6), pp. 2134–2140.

Zhang, Y., Laing, C., Steele, M., Ziebell, K., Johnson, R., Benson, A. K., Taboada, E., Gannon, V. P. J. (2007) 'Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages', *BMC Genomics*, 8(121), pp. 1-16.

Ziebell, K., Konczy, P., Yong, I., Frost, S., Mascarenhas, M., Kropinski, A. M., Whittam, T. S., Read, S. C., Karmali, M. A. (2008) 'Applicability of Phylogenetic Methods for Characterizing the Public Health Significance of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Strains', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), pp. 1671–1675.

ANEXO I

- **Datos complementarios de los aislamientos VTEC O157:H7 estudiados, pertenecientes al Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, FCV-UNCPBA:**

N° de aislamiento	Fecha	Origen	Zona	Referencia
1	1997	Hamburguesa	Mar del plata	Sanz <i>et al.</i> , 2000
2	2000	Bovino <i>feedlot</i>	Balcarce	Padola <i>et al.</i> , 2004
3	2000	Bovino <i>feedlot</i>		
4	2000	Bovino <i>feedlot</i>		
5	2000	Bovino <i>feedlot</i>		
6	2001	Bovino <i>feedlot</i>	Córdoba	
7	2002/2004	Bovino pastoreo	Tandil y alrededores	
8	2002/2004	Bovino pastoreo		
9	2002/2004	Bovino pastoreo		
10	2002/2004	Bovino pastoreo		
11	2002/2004	Bovino pastoreo		
12	2002/2004	Bovino pastoreo		
13	2006/2007	Bovino lechero	Tandil y alrededores	Fernández <i>et al.</i> , 2009; 2010
14	2006/2007	Bovino lechero		
15	2006/2007	Bovino lechero		
16	2006/2007	Bovino lechero		
17	2006/2007	Bovino lechero		
18	2006/2007	Bovino lechero		
19	2006/2007	Bovino lechero		
20	2006/2007	Bovino lechero		
21	2002	Paciente menor de 6 años con SUH	Juarez	Rivero <i>et al.</i> , 2010
22	2003	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	
23	2003	Paciente menor de 6 años con DS	Napaleofu	
24	2004	Paciente menor de 6 años con DMS	Tandil	
25	2004	Paciente menor de 6 años con SUH	Vela	
26	2004	Paciente menor de 6 años con Prolapso rectal	San Manuel	
27	2005	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	
28	2005	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	

N° de aislamiento	Fecha	Origen	Zona	Referencia
29	2007	Paciente menor de 6 años con DS-hermano de niño con SUH	Tandil	Rivero <i>et al.</i> , 2010
30	2007	Paciente menor de 6 años con DS	Tandil	
31	2007	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	
32	2007	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	
33	2007	Paciente menor de 6 años con DA	Tandil	
34	2007	Paciente menor de 6 años con DMS	Bahía Blanca	
35	2008	Paciente menor de 6 años con DA	Tandil	
36	2008	Paciente menor de 6 años asintomático con hermano con SUH	Tandil	
37	2008	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	
38	2009	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	
39	2009	Paciente menor de 6 años con DS	Tandil	
40	1996/97	Paciente menor de 6 años con SUH	C.A.B.A.	Sanz, no publicado
41	1999	Paciente menor de 6 años con SUH	Mar del Plata	
42	2014	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	No publicado
43	2014	Paciente menor de 6 años con SUH	Tandil	

SUH: síndrome urémico hemolítico; DS: diarrea con sangre, DMS: diarrea muco-sanguinolenta, DA: diarrea acuosa.

ANEXO II

Composición de medios de cultivo, soluciones, *buffer* y geles:

- *Buffer* PBS

NaCl	0,15 M
NaH ₂ PO ₄ / NaH ₂ PO ₄ , pH= 7,4	0,10 M

- *Buffer* para electroforesis TBE 10x

Tris Base	107,8 g/l
Na ₂ EDTA (pH 8,0)	7,44 g/l
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	55 g/l

- Caldo Luria-Bertani (LB)

Tripteína	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	5 g/l

Ajustar el pH a 7,5 con NaOH y esterilizar por autoclave(121°C, 15 min)

- Gel de agarosa al 2 % (peso/volumen)

Agarosa	1,4 g
TBE 1x	70 ml
Bromuro de etidio	8 µl

- Gel agarosa al 3 % (peso/volumen)

Agarosa	2,1 g
TBE 1x	70 ml
Bromuro de etidio	8 µl

- *Loading buffer*

Xilencianol	10 mg
Azul de bromofenol	10 mg
EDTA 0.5M	200 µl

- Medio MEM con penicilina y estreptomicina

Volumen final:	1000 ml
----------------	---------

Medio esencial mínimo con solución de Earle	9,6 g
NaHCO ₃	2,2 g
3-isobutil-1 metil xantina	0,01 g
Penicilina	100 mg
Estreptomicina	200 mg
Ajustar pH a 6,9, filtrar con membrana de 0,22 mm de diámetro.	

- Solución de bromuro de etidio

Bromuro de etidio	10 mg/ml
-------------------	----------

ANEXO III

Electroforesis en geles de poliacrilamida

a- Reactivos y soluciones empleados en las corridas de electroforesis.

- Acrilamida/bisacrilamida 6 % desnaturalizante (Volumen final: 200 ml)

Acrilamida/bisacrilamida 40 %	30 ml
<i>Buffer</i> TBE 10x	20 ml
Urea	92 g
Agua destilada	70 ml

- Acrilamida/bisacrilamida 40 % desnaturalizante (Volumen final: 100 ml)

Acrilamida	38 g
Bisacrilamida	2 g
Agua destilada	csp*

*csp: cantidad suficiente para.

- *Buffer* TBE 10x (Volumen final: 1000 ml)

Tris Base	107,8 g
EDTA	7,44 g
Ácido bórico	55 g
Agua destilada	csp*

*csp: cantidad suficiente para.

- *Loadingbuffer* desnaturalizante

Formamida	10 ml
Xilencianol	10 mg
Azul de bromofenol	10 mg
EDTA 0.5M	200 µl

b- Procedimiento de tinción con sales de plata.

Finalizada la corrida electroforética, se coloca el gel en solución fijadora, durante al menos 20 minutos. Pasado ese tiempo se reserva el ácido acético en un recipiente y se enjuaga el gel mediante 3 lavados de 2 minutos cada uno con agua destilada. Luego, se lo sumerge en la solución de tinción durante 30 minutos en penumbra. Transcurrido el tiempo de tinción, se descarta dicha solución, se enjuaga por 10 segundos con agua destilada y se agrega la solución de revelado. Una vez detectadas las bandas (entre 5 y 10 minutos aproximadamente) se detiene el revelado con la solución fijadora antes reservada (2-5 minutos) y, posteriormente, se enjuaga el gel durante 2 minutos con agua destilada y se deja secar al aire.

c- Soluciones empleadas en la tinción con sales de plata.

Solución fijadora (Volumen final: 500 ml)

Ácido acético	50 ml
Agua destilada:	450 ml

- Solución de tinción (Volumen final: 500 ml)

Nitrato de plata	0,5 g
Formaldehido 37 %	750 µl

- Solución de revelado (Volumen final: 500 ml)

Carbonato de sodio	15 g
Formaldehido 37 %	750 µl
Tiosulfato de sodio 10 %	100 µl
Agua destilada:	500 ml

ANEXO IV

Comunicaciones a Congresos surgidas de esta Tesis

1- González, J.; Sanso, A. M.; Bustamante, A. V. 2013. *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7: caracterización mediante LSPA6 y perfil de virulencia plasmídico. XIII Congreso Argentino de Microbiología. CABA. 23-26 septiembre. Revista Argentina de Microbiología (2013). Supl. 1 - Vol. 45, 73.

2- González, J.; Bustamante, A. V.; Sanso, A. M. 2013. *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7: identificación de subtipos. Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. La Plata. 19-20 septiembre. <http://www.concic2013.com.ar/posters.html>

3- González, J.; Sanso, A. M.; Bustamante, A. V. 2013. Trazabilidad de una infección alimentaria utilizando métodos moleculares. IV Jornada de Alimentación de Olavarría. Olavarría. 9 octubre. CD.

4- González, J.; Cadona J. S.; Sanso, A. M.; Bustamante, A. V. 2014. Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from argentinean pampean region: pathogenicity islands and effectors genes. X Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE. 2-4 julio. Ciudad de Mar del Plata. Libro de resúmenes, MM-015.

5- Lucchesi, P.; Etcheverría, A.; Sanso, A., Krüger, A.; Bustamante, A.; Colello, R.; Cadona, J.; **González, J.;** Ruiz, J.; Cáceres, E.; Burgán, J.; Sanz, M.; Arroyo, G.; Lenzi, L.; Fernández, D.; Padola, N. 2014. *Escherichia coli* verotoxigénica: reservorios, variabilidad genética y virulencia. 16° Encuentro Nacional de Investigación Pediátrica. 4-5 de julio. Ciudad de Tandil. Libro de resúmenes, pág. 25.

6- González, J.; Cadona, J.S.; Sanso, A. M.; Bustamante, A. V. 2015. Genotypic characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 from Argentina. 9th Internacional Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, Massachusetts, United States. 13-16 de septiembre. Poster Abstracts group B - Diagnostics, Typing and Phylogenetics, pág. 40-41.

7- Cadona J.S.; **González J.**; Bustamante A.V.; Sanso A.M. 2015. VTEC in Argentina: First screening of the circulating clones using multilocus sequence typing (MLST). 9th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2015). Boston, Massachusetts, United States. 13-16 de septiembre. Poster Abstracts group B - Diagnostics, Typing and Phylogenetics, pág. 42-43.

8- Colello, R.; Krüger, A.; Ruiz, J.; Sanso, M.; Bustamante, A.; Sanz, M.; Arroyo, G.; Fernández, D.; Cadona, J.; **González, J.**; Burgan, J.; Cáceres, E.; Lucchesi, P.; Etcheverría, A.; Padola, N. 2015. Desde la granja a la mesa: situación de *Escherichia coli* verotoxigénico en Argentina. 9as. Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Mar del Plata, Argentina. 28 y 29 de agosto, 2015. <http://cvpba.org/wp-content/uploads/2015/09/5.microbiologia.pdf>

9- Bustamante, A.V.; **González, J.**; Cadona, J.S.; Sanz, M.; Sanso, A.M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* diarreogénico a partir de vegetales para el consumo humano de la región pampeana. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino ALAM-CAM 2016, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME y la Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB). 26 al 30 de septiembre de 2016. Libro de resúmenes, MA-0267.

10- Sanso, A.M.; Cadona, J.S.; **González, J.**; Bustamante, A.V. 2016. Clones circulantes de *Escherichia coli* verotoxigénico no-O157 aislados en Argentina. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino ALAM-CAM 2016, IV Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos – CLAMME y la Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y Otras Micobacteriosis (SLAMTB). 26 al 30 de septiembre de 2016. Libro de resúmenes, MA-0228.

11- Lucchesi, M.P.; Etcheverría, A.; Kruger, A.; Sanso, M.; Bustamante, A.; Fernández, D.; Sanz, M.; Colello, R.; Cáceres, E.; Ruiz, J.; Burgán, J.; Cadona, J.; **González, J.**; Hernandez, L.; García, M.; Vélez, V.; Arroyo, G.; Padola, N.L. Síndrome urémico hemolítico: eco-epidemiología del enemigo que afecta la seguridad alimentaria. Cuarto Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires. 1 de septiembre de 2017. http://concyt.cic.gba.gob.ar/?page_id=580

12- González, J.; Cadona, J.S.; Sanso, A. M.; Bustamante, A. V. 2018. Diversidad genética de aislamientos de *Escherichia coli* verotoxigénico O157:H7 circulantes en Argentina. I Jornada de Microbiología General MicroGen. 13 de abril. Ciudad de Mar del Plata. Libro de resúmenes, Póster MG3, pág. 394.

13- Cadona, J.S.; González, J.; Bustamante, A.V.; Sanso, A.M. 2018. *Escherichia coli* verotoxigénico: detección de la Isla de Patogenicidad (OI)-122 y su asociación con seropatotipos en cepas no-O157 aisladas en Argentina. I Jornada de Microbiología General MicroGen. 13 de abril. Ciudad de Mar del Plata. Libro de resúmenes, Póster MG1, pág 392.

14- Colello, R.; Velez, M.V.; Montero, D.A.; **González, J.;** Bustamante, A.V.; Del Canto, F.; Etcheverría, A.I.; Vidal, R.; Padola, N.L. 2018. First report of the novel pathogenicity Island of Adhesion and Autoaggregation (LAA) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* LEE negatives from Argentina. 10th Internacional Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC 2018).Florence, Italy. 06-09 de mayo. Program & Abstract Book, pág. 112.

Publicaciones surgidas de esta Tesis

- 1- **González, J.**, Sanso A.M., Lucchesi P.M.A. & Bustamante, A.V. 2014. Comparison of two proposed MLVA protocols for subtyping non-O157:H7 verotoxigenic *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 78: 328-332.
- 2- Sanso, A.M., Bustamante A.V., Franci T., **González J.**, Cadona J.S., Lucchesi P.M.A. 2015. Serotype distribution of plasmid-encoded virulence profiles, and identification of *espP* and *subAB*alleles in verotoxigenic *Escherichia coli*. *British Microbiology Research Journal*. 5(5): 396-404.
- 3- Cadona, J.S., Bustamante, A.V., **González, J.** & Sanso, A.M. 2016. Genetic relatedness and novel sequence types of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.6:93.
- 4- **González, J.**, Sanso, A.M., Cadona J.S. & Bustamante, A.V. 2017. Virulence traits and different *nle* profiles in cattle and human verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 strains from Argentina. *Microbial Pathogenesis*. 102 (2017) 102-108.
- 5- **González, J.**, Cadona, J.S., Sanz, M., Bustamante, A.V & Sanso, A.M. 2017. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from vegetables in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 261 (2017) 57–61.
- 6- Cadona, J.S., Bustamante, A.V., **González, J.** & Sanso, A.M. 2018. Pathogenicity islands distribution in non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Genes*. 9, 81.
- 7- Colello, R., Vélez, V., **Gonzalez, J.**, Montero, D., Bustamante, A., Del Canto, F., Etcheverría, A., Vidal, R., Padola, N. 2018. First report of the distribution of *Locus* of Adhesion and Autoaggregation (LAA) pathogenicity island in LEE-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from Argentina. *Microbial Pathogenesis*. doi: 10.1016/j.micpath.2018.07.011.